2009 年度

修士論文

新規グリコシルグリセロールの合成とその特性

Synthesis of novel glycosylglycerols and their characteristics

高知工科大学大学院工学研究科

基盤工学専攻　物質・環境システム工学コース

1125021　吉本雄大

主査　指導教員　有賀修 准教授

副査　松元信也 教授　大濱武 教授

2010 年 3 月 19 日

目　次

緒　言 6

1 章　紅藻類マクサからのガラクトシルグリセロールの精製とその特性 10

1.1　目的 10

1.2　実験方法 10

1.2.1　材料の調製 10

1.2.2　抽出条件と実験試料の調製 11

1.2.3　精製法の検討 11

1.2.3.1　溶媒抽出におけるフェニルホウ酸（PhB）の添加効果の検討 11

1.2.3.2　活性炭を用いた精製 11

1.2.4　酸加水分解 14

1.2.5　分析方法 14

1.2.5.1　ガラクトースの酵素的定量 14

1.2.5.2　フェリシアナイド法 14

1.2.5.3　ジニトロサリチル酸法 14

1.2.5.4　液体クロマトグラフィー分析 15

1.2.5.5　LC-MS 分析 15

1.2.5.6　NMR 分析 15

1.2.5.7　薄層クロマトグラフィー分析 16

1.2.6　Gal-G の検量線作成 16

1.2.7　機能性試験 16

1.2.7.1　α-アミラーゼ活性化試験 16

1.2.7.2　α-グルコシダーゼ活性阻害試験 17

1.2.7.3　β-ガラクトシダーゼ活性に対する影響 17
1.2.7.4　SOD 様作用試験 17
1.2.7.5　チロシナーゼ活性阻害試験 18
1.2.7.6　アンジオテンシン変換酵素（ACE）活性阻害試験 18
1.2.7.7　セルラーゼ活性試験 18
1.2.7.8　リパーゼ活性試験 19
1.2.7.9　メイラード反応性 19
1.2.7.10　抗菌性 19
1.2.7.11　Gal-G の消化実験 20
1.3　結果と考察 20
1.3.1　紅藻類からの Gal-G の同定 20
1.3.2　紅藻類からの Gal-G の抽出 24
1.3.3　紅藻類マクサからの Gal-G の精製 25
1.3.3.1　溶媒抽出におけるフェニルホウ酸（PhB）の添加効果 25
1.3.3.2　活性炭を用いた精製 25
1.3.4　精製物の酸加水分解 26
1.3.5　TLC による加水分解物の分析 27
1.3.6　Gal-G の消化性 27
1.3.7　Gal-G の機能性の評価 28
2 章　グリコシルグリセロールの簡便な合成とその特性 47
2.1 目的 47
2.2 実験方法 47
2.2.1　糖と多価アルコールまたは糖アルコールとの合成方法及び反応性の評価 47

2.2.2　糖類とグリセロールの反応性の比較 48

2.2.3　Gal-G 合成における反応条件の検討 48

2.2.4　活性炭を用いた精製 48

2.2.5　有機溶媒を用いた抽出法の検討 49

2.2.6　酸加水分解 49

2.2.7　分析方法 49

2.2.7.1　薄層クロマトグラフィー 49

2.2.7.2　シリカゲルクロマトグラフィー 49

2.2.8 機能性試験 50

2.2.8.1　Gal-G と Glu-G の消化性 50

2.2.8.2　加熱安定性・加熱着色性 51

2.2.8.3　う蝕原性 51

2.3　結果と考察 51

2.3.1　糖と多価アルコールまたは糖アルコールとの反応性の評価 51

2.3.2　Gal-G の合成条件の検討 53

2.3.3　Gal-G の精製法の検討 53

2.3.4　質量分析 54

2.3.5　酸加水分解 55

2.3.6　合成物の分離・精製 56

2.3.7　機能性の評価および紅藻類マクサ由来フロリドシドとの比較 56

結　言 77

謝　辞 78

参考文献 79

緒　言

ガラクトシルグリセロール（Gal-G）は、ガラクトースとグリセロールがエーテル結合した構造をしており、グリセロールの 1 位（1-O-）または 2 位（2-O-）にガラクトースが結合した型、ガラクトースのアノマーの炭素の配向によってαとβ型、グリセロールの鏡像異性により S 体と R 体など多数の異性体が存在する（Fig.1）。紅藻類は、細胞内で浸透圧の調節を行うために、光合成の代謝産物として α-Gal-G を生産していると考えられ、含有量と 1-O-と 2-O-の異性体の比率は、季節や採取場所によって異なることが報告されている[1-2]。これまでに、紅藻類から得られたα-Gal-G が、Galili エピトープ（Galα(1–3)Galβ(1–4)GlcNAc）の末端構造に類似しており、古典的な補体経路を活性化することが報告されている[3]。 また、Gal-G は難消化性であり、腸内まで到達し特異的にビフィズス菌の増殖を促進すると報告されている[4]。さらに、イセチオン酸[5]やフェニルプロパノイド[6]と共存し、ウニの変態を誘導する因子と考えられるなどの機能性が報告されている。

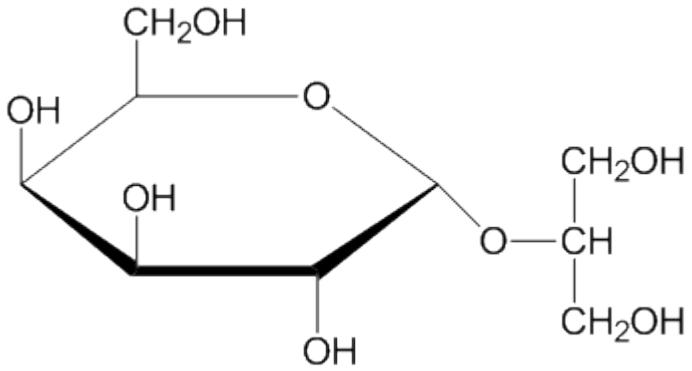
水抽出による紅藻類の Gal-G の精製については、既に石原により報告されており、彼の方法では高分子化合物の抽出が抑制され、ジエチルエーテルやクロロホルム等の有機溶媒を使用しないため、抽出後、食品への応用が可能であると思われる[7]。著者も、紅藻類のテングサから水抽出して得られた成分について構造分析を行い、既存の報告と比較を行うと共に、その成分の精製方法及び機能性について評価した。

Gal-G のように糖のアノマーの炭素とグリセロールがエーテル結合した物質は、グリコシルグリセロール（Gly-G）と呼ばれ、現在までにいくつかの Gly-G が知られている。グルコシルグリセロール（Glc-G）は、シアノバクテリアや清酒中に含まれる成分であり、高い保湿性を有することから化粧品への添加が行われている[8]。さらに、低いメイラード反応性、難消化性、非う蝕性、ガン細胞の HL60 に対する阻害効果など数多くの機能性が報告されており、民間企業でも研究が進んでいる[9]。また、グリセロ糖脂質は、分子内に親水性と疎水性部分を合わせ持ち、非イオン系界面活性剤としての機能を有しているため、食品、化粧品といった分野での利用が期待されており、リパーゼを用いた酵素法によるグリセロ糖脂質合成の前駆体として Gly-G を用いる研究も報告されている[10-11]。さらに、グリセロ糖脂質に腫瘍形成に関わる Epstein-Barr virus

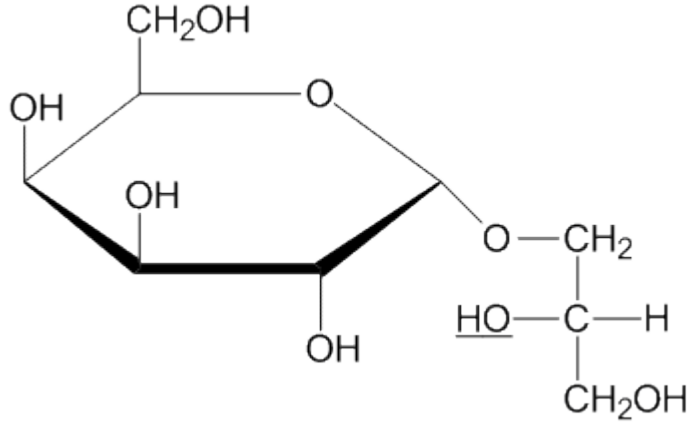
(EBV) 活性の阻害効果[12-15]、抗炎症作用[16-18]、リパーゼ活性阻害[19]が顕著に見られるだけでなく、近年では、骨粗鬆症の予防として破骨細胞の形成阻害[20]やアポトーシス誘導活性[21]、DNA ポリメラーゼの特異的な阻害[22-23]なども報告されている。また、天然には存在しない鎖長の脂肪酸を用いて合成されたガラクトリピッドが、高い EBV 活性阻害効果[24]を示すことが報告されており、グリセロ糖脂質を化学的または酵素的に合成して機能性を評価するためにも、安定的な原料 (Gly-G) の供給も重要な課題である。

これまでに Glu-G においては、安定的な供給のために合成法が考案されている。アセチル化されたグルコースを原料に有機化学的かつ多段階な手法[25]、Sucrose phosphorylase によって高収率・高純度（63%, 98%以上）でα型の Glu-G を得る方法[26]や、β-glucosidase CelB によってセロビオースからβ型のみを得る酵素法[27]などが報告されているが、どれも安価に生産できる手法とは言えない。工業的には、マルトオリゴ糖とグリセロールとの混合液にα-glucosidase を作用させ、糖転移反応により Glu-G を生産し、残存するマルトオリゴ糖を糖化酵素で加水分解し、グルコースとグリセロールを資化する微生物の培養により高収率・高純度（66%, 98%以上）でα型の Glu-G が得られている[28]。Glu-G の大量生産法については研究があるものの、他の Gly-G の大量生産法についてはほとんど確立されていない。Nakano らは、Galactanase を用いてアラビノガラクタンからβ型の Gal-G とガラクトビオシルグリセロールを得た[29]。Shinoyama らは、β-Xylosidase を使い、キシロビオースからキシロシルグリセロールを得る方法を提案した[30]。また、Michel らは、アセチルガラクトピラノースから 5 段階の反応でα型の 2-O-Gal-G を収率 53%で立体選択的に合成した[31]。しかし、いずれの方法においても必要とする酵素が高価であることや収率が低い、複雑な精製や多段階な操作を伴うなど大量生産を行うためには問題点が存在する。

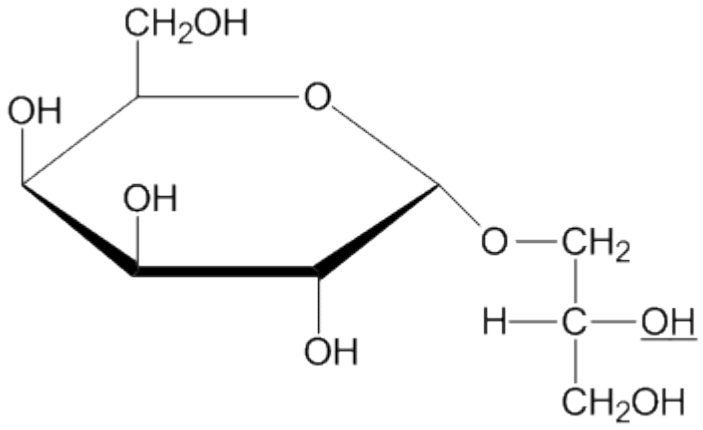
そこで本研究では、より安価に Gly-G の大量生産を行うための合成方法について検討し、多段階で複雑な操作を伴わず、高収率・高純度の Gly-G を得る簡便な化学的合成法を確立した。合成した Gly-G については、構造分析および機能性の評価を行った。また、同様の手法を用いてグリセロール以外の多価アルコール、糖アルコールなどと糖の結合を試み、新規のグリコシル化合物の合成の可能性を示した。



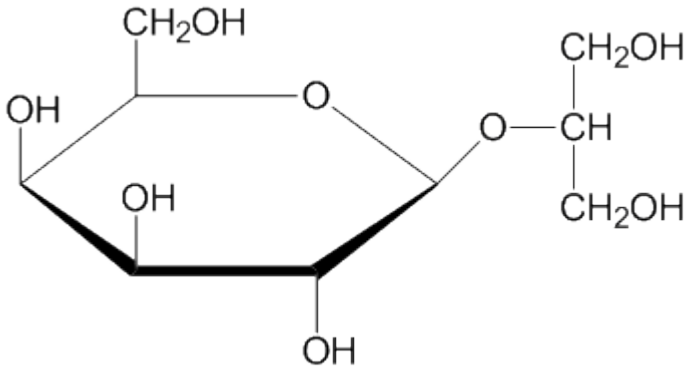
2-O-α-D-ガラクトシルグリセロール（2-O-α-Gal-G、フロリドシド）



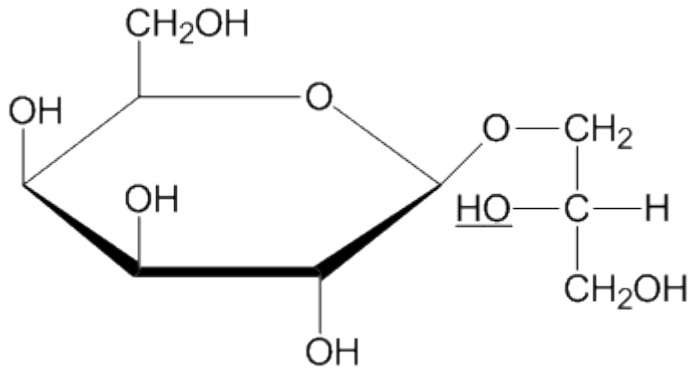
1-O-α-D-ガラクトシル-S-グリセロール（1-O-α-Gal-S-G、L-イソフロリドシド）



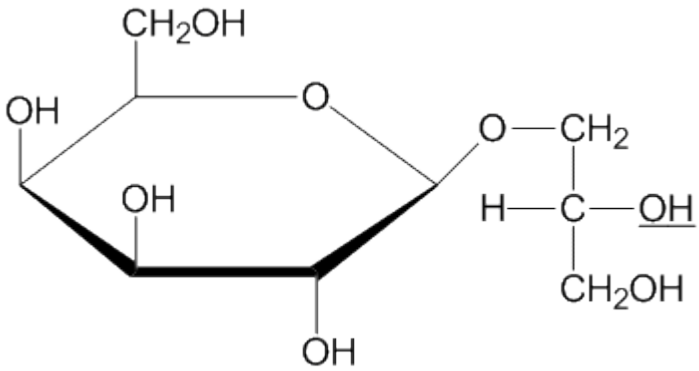
1-O-α-D-ガラクトシル-R-グリセロール（1-O-α-Gal-R-G、D-イソフロリドシド）



2-O-ß-D-ガラクトシルグリセロール（2-O-ß-Gal-G）



1-O-ß-D-ガラクトシル-S-グリセロール（1-O-β-Gal-S-G）



1-O-ß-D-ガラクトシル-R-グリセロール（1-O-β-Gal-R-G）

Fig.1　ガラクトシルグリセロールの構造

1章　紅藻類マクサからのガラクトシルグリセロールの精製とその特性

1.1　目的

実用化に向けたGal-Gの抽出・精製法に関する研究報告は、著者が知る限りで石原の考案した手法だけである。石原は、紅藻の水抽出液を限外濾過した後に電気透析またはイオン交換樹脂によって精製している[7]。本研究では、紅藻類から水抽出により得られた成分のその後の精製法として、フェニルホウ酸を用いた抽出法及び活性炭を用いた吸着法を検討した。フェニルホウ酸は、ジオール類に対して高い親和性を持つことが知られており、糖類の精製に利用されている。竹村は、フェニルホウ酸を添加することでアセトニトリルやアセトンといった有機溶媒中の寒天オリゴ糖の溶解度が上昇することを報告している[32]。これまで、Gal-Gとフェニルホウ酸の親和性に対する報告はなく、本研究では有機溶媒にフェニルホウ酸を添加し、Gal-Gの抽出・精製に対するフェニルホウ酸の添加効果を調べた。一方、Chen らは、寒天オリゴ糖の活性炭を用いた簡易的な精製法を報告している[33]。すなわち、活性炭カラムに寒天オリゴ糖を吸着させた後、蒸留水を送液して塩と単糖を除去する方法である。そこで、紅藻類から水抽出した成分中の塩やミネラル等の夾雑物の除去に同様の方法が応用できるか検討した。また、精製により得られた成分の構造分析を酸加水分解、質量分析、NMR を用いて行い、既存の報告と比較することによって成分の同定を行った。竹中らの報告では、Glu-GはTLC分析においてグルコースと同じRf値に検出されている[8]。そこで、多重展開による加水分解産物中のGal-Gとガラクトースの分離を試みた。さらに精製したGal-Gの機能性について評価した。

1.2　実験方法

1.2.1　材料の調製

実験材料の紅藻（株式会社海の研究舎から購入）として、採取時期の異なるマクサ 4 種類（2005～2008 年）、乾燥方法の異なるオゴノリ 2 種類（天日乾燥と熱風乾燥）、採取後に水で洗浄を繰り返して白くなったマクサ、スサビノリ、アマノリ、採取後冷凍保存された生のオゴノリを用いた。一部の乾燥マクサをモーター式粉砕機（高知県工業技術センター）によって粉砕し、

実験試料として使用した。生のオゴノリの場合、一部採取してオーブンで乾燥した後に使用した。

1.2.2　抽出条件と実験試料の調製

紅藻を蒸留水 1L に対して 100～250g 添加し、25℃で 24 時間振とうした。その後、試料を吸引ろ過（ガラス繊維ろ紙 GA-55、ADVANTEC 社製）により取り除き、ろ液を回収した。ろ液を沸騰水中で 3 分間加熱した後、遠心分離（8,000rpm、10 分間、4℃）によりタンパク質などを除去した。試料の一部を高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）によって分析を行った。上清液を一部凍結保存すると共に、一部を凍結乾燥した後、乳鉢を使って細かく磨り潰し冷凍保存した。これらの試料をその後の実験に使用した。

1.2.3　精製法の検討

1.2.3.1　溶媒抽出におけるフェニルホウ酸（PhB）の添加効果の検討

凍結乾燥した試料（2005 年マクサ抽出物）20mg、PhB を HPLC で推定された Gal-G 濃度に対して重量比で 1～5 の割合でアセトニトリル 1ml に添加した。密栓して 30℃で 3 時間振とうした後、上清液 900μl を採取して遠心分離（9,000rpm、3 分間）により未溶解物を取り除いた。上清液 800μl を試験管エバポレーターで減圧乾燥（90hpa、40℃）した後、60℃のオーブンで重量変化がなくなるまで乾固した。400μl の蒸留水を添加した後、HPLC 分析によって Gal-G 濃度を測定した。乾燥物重量と Gal-G 濃度から純度を算出した。

1.2.3.2　活性炭を用いた精製

活性炭粉末（cell culture tested、SIGMA 社製）を用いて以下の実験を行った。活性炭に対して糖類が吸着性を示すか確認を行うため、標準物質としてマルトース、スクロース、セロビオース、ラクトース、ソルビトール、フルクトース、マンノース、ガラクトース、グルコースを用いた。2g/l の各試料溶液 100ml に対して、活性炭 1g を添加して 25℃で 1 時間振とうした。各溶液中の糖量を HPLC 分析によって定量し、吸着量を算出した。

凍結保存されたマクサ上清液（2007 年マクサ抽出物）を溶解して使用した。吸着性の高い色素等の夾雑物の除去を行うため、試料 100ml に対して活性炭 1g を添加し 25℃で 1 時間振と

うした。吸引濾過によって活性炭を取り除き、再び活性炭 10g を添加して 25℃で 1 時間振とうした。吸引濾過によって活性炭を回収し、蒸留水 2L により活性炭を洗浄した。その後、Gal-G の脱離条件を決定するため活性炭を 8、25、70%エタノール水溶液 100ml にそれぞれ添加し、撹拌して室温で吸着物の脱離を行った。活性炭を吸引濾過によって取り除き、回収したエタノール溶液を試験管エバポレーターによって減圧除去した。その後、60℃のオーブンで重量変化がなくなるまで乾固した後、乾燥物重量を測定した。蒸留水を添加して乾燥物を再度溶解した後に、HPLC 分析によって Gal-G 量を測定した。Fig.2 に活性炭を用いた精製法の手順をまとめた。画分 A～F の純度は、乾燥物重量と Gal-G の濃度から算出した。

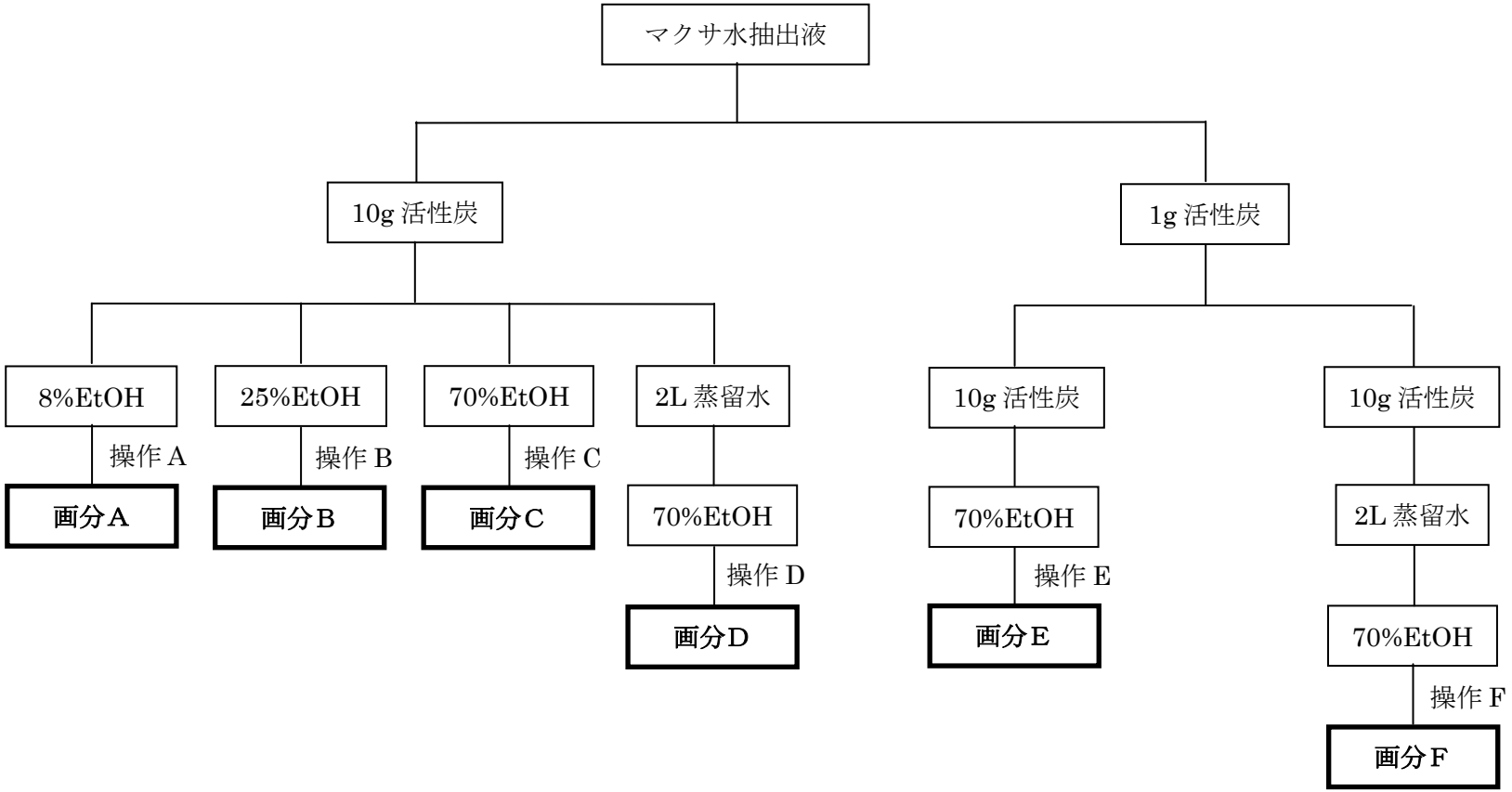


Fig2. 活性炭を用いた精製

1.2.4　酸加水分解

活性炭によって精製処理したマクサ抽出液 40ml に 1M 塩酸 10ml を加え、沸騰水中で加水分解を行った。経時的（20-180min）に試料を 3ml 採取し、氷冷下で 0.2M の水酸化ナトリウム 0.6ml を加え反応を停止させた。その後、pH メーターを使い水酸化ナトリウムで完全に中和した後、HPLC 分析を行った。加水分解によって生じたガラクトース量を、ガラクトースデヒドロゲナーゼを用いた酵素法[34]で定量した。還元糖量の定量にはガラクトースを標準物質として使用し、フェリシアナイド法[35]及び DNS（ジニトロサリチル酸）法[36]を用いた。また、加水分解前と完全加水分解した試料（180min）中のグリセロールの定量には F-キット グリセリン（Roche Diagnostics GmbH 社製） を用いた。

1.2.5　分析方法

1.2.5.1　ガラクトースの酵素的定量

ガラクトースの酵素的定量を以下のように行った。蒸留水に溶解した 10mM NAD^+ (Sigma 社製) 50μl と測定試料 0-0.2ml、1M Tris-HCl buffer (pH8.6) 0.5ml を混合し、全量が 0.9ml になるように蒸留水を加えた。10unit/ml の β-Galactose dehydrogenase（Sigma 社製、*Pseudomonas fluorescens* 由来、70.4unit/ml）25μl を加えて反応を開始し、37℃で 30min 反応させた後、340nm の吸光度を測定した。

1.2.5.2　フェリシアナイド法

フェリシアナイド試薬として、$K_3Fe(CN)_6$ 0.25g、K_2HPO_4 14.0g 及び K_3PO_4 4.2g を蒸留水 100ml に混和し調製した。褐色瓶に入れ冷蔵庫内に保存した。フェリシアナイド試薬 125μl と全量 0.5ml になるように蒸留水により調製した測定試料を沸騰水中で 5 分間反応させた後、氷水で急冷した。蒸留水を 3.75ml 加え、237nm の吸光度を測定した。

1.2.5.3　ジニトロサリチル酸法

DNS 試薬の調製を以下のように行った。A 液：4.5%NaOH 30ml と 1%ジニトロサリチル酸 88 ml を混合して、ロッシェル塩（酒石酸ナトリウムカリウム）22.5 g を溶解した。B 液：

10%NaOH 2.2ml に結晶フェノール 1 g を溶解し、蒸留水にて 10 ml にした。この液 6.9 ml に $NaHCO_3$ 0.69 g を溶解した。B 液に A 液を加えて混合し、室温にて 2 日間静置した後、安定化させた後濾過し、褐色瓶に入れ室温にて保存した。DNS 試薬 0.5ml と全量 2ml になるように蒸留水を加えた測定試料 0-0.5ml を混合して、沸騰水中で 5 分間反応させた後、氷水で急冷し、540nm の吸光度を測定した。

1.2.5.4　液体クロマトグラフィー分析

液体クロマトグラフ分析には、HPLC 装置として日立製 D-7000 を用い、検出器として RI 検出器（L-7490）を使用した。特に記述がない限り、カラムとして SugarKS-802（Shodex 社製）を用い、カラム温度 50℃、移動相として水を使用し、流速 0.8ml/min、注入量 5μl にて分析を行った。Gly-G の位置異性体の分離を行う場合、カラムとして NH_2-1251-N（Senshu Pak 社製）を用い、カラム温度 40℃、移動相として CH_3CN:H_2O（8:2）を使用し、流速 0.8ml/min、注入量 20μl にて分析を行った。

1.2.5.5　LC-MS 分析

装置として FinniganLCQ Duo system を用い、移動相として 0.05%NH_4OH:CH_3CN (25:75)、流速 0.2ml/min、カラムには Inertsil NH_2（GL Science 社製）を用い、イオン化法には ESI を用い、ネガティブモードで測定を行った。分析試料として、マクサの抽出画分 F（Fig.2）を用い、MS 及び MS/MS 測定を行った。

1.2.5.6　NMR 分析

装置として Varian^{UNITY}INOVA400 を用いた。分析試料として、マクサ、オゴノリ、アマノリ、スサビノリを用いた。マクサ及びオゴノリについては、活性炭を用いた精製により精製した画分 F（Fig.2）を分析試料とした。アマノリ及びスサビノリの NMR 測定用試料の調製を以下のように行った。各試料の水抽出液に体積あたり 70%になるようにエタノールを添加し撹拌した後、遠心分離（9,000rpm、10min）によりフィコビリン系と思われる色素を取り除いた後、活性炭を用いて画分 F（Fig.2）を得た。試料をそれぞれ D_2O に溶解し、マクサから得られた成分に

ついては^{1}H (400MHz) 及び^{13}C (100MHz) NMR 分析を行い、C と H の相関を gHSQC、gHMBC、TOCSY、NOESY を用いて確認し、他の試料については、^{1}H (100MHz) NMR 分析を行った。

1.2.5.7 薄層クロマトグラフィー分析

試料として、Gal-G の加水分解物、呈色の指標として寒天オリゴ糖、標準物質として 5g/l ガラクトースをそれぞれ 10μl スポットした。分析には、シリカゲル 60 プレート (Merck 社製)、展開溶媒として n-ブタノール:エタノール:水 (3:3:1) 混合液を用いて上昇法で 3 回多重展開を行った。検出には、アニスアルデヒド試薬 (p-アニスアルデヒド 0.1ml と氷酢酸 10ml を硫酸 0.2ml と混合) およびナフトレゾルシノール試薬 (1,3-Dihydroxynaphthalene 0.06g を 10%硫酸 30ml に溶解) を用い、展開後プレートに噴霧し 120℃のホットプレート上で加熱した。

1.2.6 Gal-G の検量線作成

Gal-G の定量を簡便に行うために HPLC 分析における検量線を作成した。精製した Gal-G を適宜希釈し、一部を HPLC にて測定した。一方、一部の試料を 0.3N 塩酸を用いて沸騰水中で完全加水分解した。NaOH で完全に中和した後、ガラクトース量を酵素法によって定量した。ガラクトースとグリセロールがモル比 1:1 で結合していると仮定し、ガラクトース量を Gal-G 量に換算した。加水分解前の Gal-G の面積値と加水分解後に定量した Gal-G 量から検量線を作成した。

1.2.7 機能性試験

1.2.7.1 α-アミラーゼ活性化試験

既報のα-アミラーゼ阻害試験を一部改変して以下のように試験を行った [37]。0.25M リン酸緩衝液 (pH7.0) に希釈した試料 0.5ml と 5g/l 可溶性デンプン (熱水中で溶解、Merck 社製) 0.3ml、同様の緩衝液 0.2ml を混合して 37℃で 5 分間プレインキュベートを行った。同じ緩衝液で希釈した 11unit/ml のα-アミラーゼ (TypeVI-B、豚の膵臓由来、SIGMA 社製) 25μl を添加して 10 分間反応を行った後、沸騰水中で 5 分間加熱して反応を停止した。反応液 125μl を採取して 0.01M ヨウ素溶液 2ml と混合し、660nm の吸光度を測定した。コントロール (試料無添加) の

場合のα-アミラーゼ活性を 1.0 とした場合の相対活性を酵素活性化率として算出した。実際にデンプンの分解が促進されているか調べるために試料を一部採取し、フェリシアナイド法を用いて還元糖量を経時的（0-120min）に測定した。

1.2.7.2　α-グルコシダーゼ活性阻害試験

既報に従って以下のように試験を行った[38]。20mM リン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した試料 1.5ml と 20mM の p-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド（PNPG、SIGMA 社製）0.5ml を混合し、37℃で 5 分間プレインキュベートした。同じ緩衝液で溶解した 0.2unit/ml のα-グルコシダーゼ（酵母由来、オリエンタル酵母工業社製）を 25μl 添加した。37℃で 10 分間反応させた後、1M 炭酸ナトリウム水溶液 3ml を添加して反応を停止し、420nm の吸光度を測定した。コントロール（試料無添加）の場合のα-グルコシダーゼ活性に対する相対活性を阻害率として算出した。また、測定試料が、遊離される p-ニトロフェノールの吸光度に影響を与えないかを調べるため、緩衝液に溶解した各試料と p-ニトロフェノール（SIGMA 社製）を混合し、420nm の吸光度を測定した。すなわち、20mM に調製した p-ニトロフェノール 250μl と 20mM リン酸緩衝液 750μl を混合した溶液の吸光度をコントロールとして、同じリン酸緩衝液に溶解した試料無添加の吸光度と比較した。

1.2.7.3　β-ガラクトシダーゼ活性に対する影響

大腸菌 E106 の培養液から菌体を回収後、超音波破砕して得た上清液を粗酵素溶液として使用した。基質として o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド（ONPG、SIGMA 社製）を用いて、前述のα-グルコシダーゼ試験と同様の方法で活性測定を行った。

1.2.7.4　SOD 様作用試験

試料を蒸留水に溶解し、SOD テストワコー（和光純薬社製）の測定マニュアルに従って SOD 様活性の測定を行った。

1.2.7.5　チロシナーゼ活性阻害試験

既報を参考にチロシン及び DOPA がチロシナーゼによって酸化されドーパキノンになる反応を測定した[39]。25mM リン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した 25mM L-DOPA（3,4-Dihydroxy-L- phenylalanine、SIGMA 社製）0.1ml と同じ緩衝液 0.4ml と DMSO（最終濃度 2.5%）に溶解した試料溶液 0.5ml を混合して全量 1ml とした。その後、1000unit/ml のチロシナーゼ水溶液（マッシュルーム由来、SIGMA 社製）25μl を添加した。30℃で 20 分間加温した後、475nm の吸光度を測定した。試料無添加（蒸留水）の場合の活性をコントロールとして、酵素活性に対する影響を評価した。基質をチロシン（2.5mM、SIGMA 社製）とする場合も同様の方法で試験を行った。

1.2.7.6　アンジオテンシン変換酵素（ACE）活性阻害試験

既報に従って以下のように実験を行った[40]。600mM の塩化ナトリウムを含む 400mM リン酸緩衝液（pH8.3）1ml に Hip-His-Leu（馬尿酸とアミノ酸で構成された合成基質、Sigma 社製）2mg を溶解し、調製した合成基質 100μl と試料 100μl を混合して 37℃で 5 分間プレインキュベートした。その後、同じ緩衝液に溶解した 0.025unit/ml のアンジオテンシン変換酵素（ウサギの肺由来、SIGMA 社製）を加え、37℃で 30 分間反応させた。1N 塩酸 250μl を加えて反応を停止し、反応生産物である馬尿酸を回収するため、酢酸エチル 1.5ml を加えてよく撹拌した後、遠心分離（3,000rpm、10 分間）を行った。酢酸エチル層 1ml を採取し、酢酸エチル（沸点 77℃）を試験管エバポレーターで減圧除去した。蒸留水 1ml を加えて撹拌し、15 分間静置して馬尿酸を溶解した後、228nm の吸光度を測定した。試料無添加（蒸留水）の場合をコントロールとして、酵素活性に対する影響を評価した。

1.2.7.7　セルラーゼ活性試験

既報のセルラーゼ活性の測定法[41]を参考に以下のように試験を行った。20g/l CMC 水溶液（カルボキシメチルセルロース、Wako 社製）0.25ml、0.5M 酢酸緩衝液（pH5.0）0.15ml、蒸留水に溶解した試料 0.5ml を混合し、37℃で 5 分間プレインキュベートした。同じ緩衝液に溶解した 1g/l のセルラーゼ（*Trichoderma* 由来、Wako 社製）を 0.1ml 加え、37℃で 10 分間反応させ

た。その後、沸騰水中で 5 分間加熱して反応を停止し、生成された還元糖量をフェリシアナイド法で定量した。試料無添加（蒸留水）の場合をコントロールとして、セルラーゼ活性に対する試料の影響を評価した。

1.2.7.8　リパーゼ活性試験

リパーゼキット S (DS ファーマバイオメディカル社製) を用いて以下のように試験を行った[42]。0.1M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 20ml にラット腸管アセトン粉末 (SIGMA 社製) 2g を添加して、氷中で 1 時間撹拌した後、遠心分離 (9,000rpm、20 分間、4℃) し、上清液をクエン酸緩衝液で 100 倍希釈して使用した。発色液 1ml に試料 50μl、酵素溶液 20μl、エステラーゼ阻害剤 20μl を添加し、30℃で 5 分間プレインキュベートした。基質溶液 100μl を添加し、暗所にて 30℃で 30 分間反応をさせた。反応停止液 2ml を添加後、405nm の吸光度を測定した。試料無添加（蒸留水）の場合をコントロールとして、リパーゼ活性に対する試料の影響を評価した。

1.2.7.9　メイラード反応性

既報[43]を参考にアミノ酸と試料（テングサ由来 Gal-G）を加熱した際に生成される縮合物の着色性を指標として評価した。標準物質としてグルコース、ガラクトース、スクロース、α-メチルグルコシド (Wako 社製)、グルコサミン水和物 (Sigma 社製)、アミノ酸としては、最もメイラード反応性の高いグリシンを用いた。0.5%グリシンと 1%試料を含む 20mM リン酸緩衝液 (pH8.0) 1ml を密栓して 100℃で 1 時間加熱した後、450nm の吸光度を測定した。

1.2.7.10　抗菌性

冷凍保存された大腸菌 E106 を L.B.培地にて 25℃で 600nm における培地濁度 0.5 になるまで培養した。その後、体積あたり 1%の濃度で L.B.培地に植菌し、37℃で 21 時間培養した。5g/l Gal-G を含む L.B.寒天プレートに、生理食塩水で 100 万倍希釈した大腸菌の培養液 50μl をコンラージ棒にて塗布した。37℃で一昼夜静置保存した後、形成されたコロニー数をカウントした。Gal-G 無添加をコントロールとして大腸菌に対する増殖抑制効果を評価した。

ピロリ菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA)、多剤耐性緑膿菌（MDRP）に対す

る Gal-G の添加効果を平板希釈法により評価した。(高知大学医学部に依頼)

1.2.7.11　Gal-G の消化実験

大腸菌由来β-ガラクトシダーゼ（β-ガラクトシダーゼ活性試験と同じ)、セルラーゼ 2 種類（明治製菓社製メイセラーゼ、Wako 社製)、天野エンザイム社製のリパーゼ A（至適条件：pH7、45℃)、リパーゼ G（pH6、40℃)、リパーゼ R（pH7、40℃)、リパーゼ AY（pH7、45℃)、リパーゼ PS（pH7、45℃)、ニューラーゼ F3G（pH7、40℃）を用いた。5g/l Gal-G を含む 20mM リン酸緩衝液(pH7.0)に同じ緩衝液で適宜希釈したβ-ガラクトシダーゼ粗酵素溶液 25μl を添加し、37℃で 24 時間加温した。5g/l Gal-G を含む 0.5M 酢酸緩衝液（pH5.0）1ml に各セルラーゼ 10mg を添加し、37℃で 24 時間加温した。5g/l Gal-G を含む 20mM リン酸緩衝液（各リパーゼの至適 pH に調製）1ml に各リパーゼ 10mg を添加し、各酵素の至適温度にて 24 時間加温した。沸騰水中で 3 分間加熱し、遠心分離（8,000rpm、3min）した後、HPLC 分析により Gal-G の定量を行った。酵素無添加の場合をコントロールとして各試料の Gal-G に対する消化性を評価した。

1.3　結果と考察

1.3.1　紅藻類からの Gal-G の同定

Fig.3 は、24 時間振とうしたマクサ水抽出液（100g/l-蒸留水）の HPLC クロマトグラムである。マルトースの保持時間 10.9min とグルコースの保持時間 12.6min の間、11.5min に何らかのピークが検出された。

Fig.4-a は、マクサ水抽出物（画分 F）の LC-MS クロマトグラムを示す。HPLC 分析と同様に Gal-G と思われる単一のピークが得られた（Fig.4-b)。このピーク範囲について質量分析を行ったところ、m/z 253.21 に最も強いシグナルを示した（Fig.4-a)。測定モードを ESI-ネガティブで行ったため、マイナスチャージにイオン化され、$[M-H]^-$として検出されたと考えられる。このことから、Gal-G の構造式（$C_9H_{18}O_8$; 254.23g/mol）から推測された分子量に一致する分子量であることが分かった。また、MS クロマトグラムにおける m/z 253.21 のピークについての MS/MS スペクトルを測定した（Fig.5)。ガラクトースとグリセロールの間の結合が切れたと考え

られるガラクトース m/z 179[M-H]⁻と推測されるシグナルが観測された。また、ガラクトースから水が脱離したと思われるシグナル（m/z 160）も見られた。

マクサ抽出物の ^{1}H-NMR スペクトルを Fig.6 に示した。Table 1 は、紅藻類から報告のあるα-Gal-G の ^{1}H 化学シフトを示す。フロリドシドとイソフロリドシドのガラクトースの特徴的な H-1 化学シフトは、それぞれ 5.14ppm と 4.93-4.94ppm に検出され、イソフロリドシドの DL 体が混在する場合、トリプレットシグナルを示すことが報告されている[44]。また、フロリドシドの H-5 のガラクトースのトリプレットシグナルは、4.09ppm に検出される[45]。L-イソフロリドシドの ^{1}H 化学シフトについては、ほぼ単一成分で分析された報告が存在するが全ての H について帰属されていない[44]。Gal-G の H-1 シグナルを示す 4.9-5.2ppm の範囲に観測されたシグナルは、フロリドシドを示す 5.14ppm のダブレットシグナルのみであった。フロリドシドの特徴的な H-5 のトリプレットシグナルも観測されている。フロリドシドにおいて 3.7ppm より高磁場側にはシグナルが一切観測されていない。gHSQC により C に結合している H を決定し、3.72-3.81ppm の範囲に H-6、H-1’、H-3’が含まれることを確認したが、シグナルが重なり合い、今回の解析においては帰属できなかった。しかし、他の化学シフトについては、既報のフロリドシドの値と一致している。ガラクトースとグリセロールの結合の配向については、H-1 と H-2 の結合定数、またはアキシアルであるβ型の H-1 からの NOE 差スペクトルから空間的に H-2、H-3、H-4 が近いことを示すことで判断できる。Fig.6 の ^{1}H-NMR スペクトルの H-1 シグナルから算出された結合定数（$J_{H\text{-}H}$値）は、4Hz であった。標準物質のα-ガラクトース 3.7Hz、β-ガラクトース 7.8Hz であることと、既報[45]のα-Gal-G の 4Hz から考えてもアノマー炭素の配向がαであると推定した。

Fig.7 は、マクサ水抽出物の ^{13}C NMR スペクトルを示す。また、マクサ水抽出物とフロリドシドに関連する化合物の ^{13}C 化学シフトについて既報の値との比較を Table 2 示す。Simon-Colin らは、^{13}C NMR において 81.6ppm にフロリドシドの C-2’の特徴的なシグナルが観測されることを報告している[45]。糖とアルコールが結合する場合に、糖のアマノーの炭素とアルコールの置換位置の炭素の化学シフトが低磁場側にシフト（グリコシレーションシフト）することが報告されている[46]。特に糖のアノマーの炭素は、酸素に挟まれることで非遮蔽により最も特徴的に低磁場シフトを起こす。α-ガラクトースの C-1 とグリセロールの C-2’の化学シフトが、

低磁場側にシフトしていることが確認できる。リファレンス補正を行っていないため、既報の化学シフトより全体が多少高磁場側にシフトしている。しかし、それを考慮すれば、観測された全てのシグナルが、既報[44-45]のフロリドシドの化学シフトに帰属することを確認した。

Fig.8 は、DEPT135 スペクトルを示す。帰属された炭素（Fig.8-c）と比較すると、C-6'、C-1'、C-2'が CH_2 であり（Fig.8-a）、残りは CH であること（Fig.8-b）が確認できた。Gal-G が、分子構造中に酸素を介する化合物であることから、今回の TOCSY による解析からは、ガラクトースの C-1 にグリセロールが結合していることは確認できなかった。しかし、gHMBC ではガラクトースの H-1 とグリセロールの C-2'との強い相関が見られ、NOESY においても H-1 と H-2'が空間的に近いことが確認された。以上の結果から、マクサ水抽出物中の主成分が、フロリドシド（2-O-α-Gal-G）であると同定した。

フロリドシド: ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ_H = 5.14*d* (H1, $J_{H\text{-}H}$ 4Hz), 4.09*t* (H5), 3.99*d* (H4), 3.89*m* (H3), 3.82*m* (H2), 3.81-3.72*m* (H6,1',3'), 3.79*m* (H2'). ^{13}C-NMR (100MHz, D_2O): δ_C = 98.2 (C1), 78.8 (C2'), 71.2 (C5), 69.4 (C3), 69.3 (C4), 68.6 (C2), 61.5 (C1'), 61.2 (C6), 60.4 (C3'). LC-MS: *m/z* = 253.21 $[M\text{-}H]^-$.

Fig.9 は、オゴノリ、スサビノリ、アマノリから得られた抽出物の ^{1}H NMR スペクトルを示す。フロリドシドに関するシグナルには F、D および L - イソフロリドシドにはそれぞれ D と L と図中に表記した。他の紅藻においてもマクサ同様に、全ての試料でα-Gal-G と思われる化学シフトを示した。Bondu らは、D 体のイソフロリドシドの場合、最も高磁場側の 3.42-3.47ppm にグリセロールの H-1'のマルチプレットシグナルを示すことを報告している[47]。Meng らおよび Bondu らの報告では、イソフロリドシドの H-1 トリプレットの低磁場側が D 体であることが示されている[44,47]。アマノリおよびスサビノリにおいてフロリドシドとイソフロリドシドの位置の両方にシグナルを示し、その割合はイソフロリドシドの方が多かった。フロリドシドの H-1 の積分値を 1 としてイソフロリドシドの比率を算出したところ、アマノリに 1:6、スサビノリには 1:8.6 の割合でイソフロリドシドが含まれていることが確認できた。また、高磁場側のシグナルが明らかに強いことから、L 体のイソフロリドシドが最も多いことが分かった。*Rhodophyta* におけるフロリドシドと *P. malhamensis* における L-イソフロリドシドの生合成については、フロリドシド-リン酸と L-イソフロリドシド-リン酸を与える UDP-ガラクトースと L-グリセロール-3-リン酸

の縮合反応によって示されている[2]。また、D-イソフロリドシドの前駆体はD-グリセロールと考えられているが、その合成経路については完全には把握されていない[2]。このように合成経路の違いからアマノリ及びスサビノリにおいてDL体の混在比が異なったと示唆される。また、β型のGal-Gは小麦に含まれる[4]という報告があるが、紅藻類から得られた報告はない。今回、マクサから得られた成分もα型であり、生合成の過程で特異性を持った酵素が働いていると推測される。浸透圧の調節について生合成されたα-Gal-Gの消費を観察した実験で、フロリドシドが消費されるに対して、イソフロリドシドは消費されないことが示されている[1]。このことから、浸透圧の調節に活性であるフロリドシドは消費され、イソフロリドシドの含有量が多くなる傾向であると推察される。Bruceは、紅藻類テングサ属 *Gelidium coulteri* における窒素と光による炭素循環の調節についての報告[48]の中でフロリドシドの存在を示しているが、異性体の存在については何ら記述していない。Mengらは、フロリドシドの単一のNMRデータを示しているが、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製後に測定している[45]。また、他の種属の紅藻類においてもフロリドシドが単一成分で得られた報告はなく、テングサ属マクサ（*Gelidium amamsii*）からフロリドシドのみが得られたことは生物学的に非常に興味深い結果である。オゴノリについては、構造決定を行っていないが ^{1}H-NMR 分析から極微量と思われるイソフロリドシドの存在が4.9ppm 付近のトリプレットシグナルから確認された。しかし、アマノリやスサビノリのフロリドシドに対するイソフロリドシドの混在比から考えるとテングサ属だけでなくオゴノリ属（*Gracilaria vermiculophylla*）においても同じ現象が確認されたことは、寒天の原料である何らかの共通点があるのではないかと考えられる。また、フロリドシドのみの生理活性を評価する上でマクサ（2007年採取）は、重要な実験材料であると言える。

NMR分析（Fig.9）によって3種類の異性体の存在が確認されたアマノリおよびスサビノリについてもカラムにSugarKS-802を用いたHPLC分析でFig.3と同じ保持時間に単一のピークを示すことが分かった。

紅藻類には、フロリドシド、イソフロリドシドの 2 種類の位置異性体が含まれている。グリコシルグリセロールの位置異性体の分離には、アミノカラムを用いて溶媒組成 H_2O:CH_3CN (1:4) で分離する方法が報告されている[8,47]。しかし、マクサ水抽出液のアミノカラムを用いたHPLC分析において、単一のピークを示し、混合物は確認されなかった（Fig.10）。

Fig.11 にフロリドシドを用いて作成した検量線を示す。縦軸には適宜希釈したフロリドシド水溶液の HPLC 分析からの面積値を示した。横軸には各水溶液について酸加水分解後にβ-Galactose dehydrogenase を用いた酵素法によりガラクトースを定量し、グリセロールとモル比 1:1 と仮定して Gal-G 濃度に換算した値を示した。分析の結果、HPLC 分析からの面積値と酵素法からの Gal-G 濃度とは比例関係にあり、面積値 10 万でフロリドシド 1g/l を示すことが分かった。従って、本研究における Gal-G 濃度は全てこの検量線から算出した値で示す。

1.3.2　紅藻類からの Gal-G の抽出

Fig.12 は、蒸留水 1L に対するマクサ添加量を変えた場合の結果である。乾燥されたマクサ（2007 年採取）を細かく粉砕して用いて抽出することにより、より多くの Gal-G が得られることが分かった。マクサから Gal-G を抽出する場合の振とう条件について検討したところ、振とう（60rpm）10 分後には Gal-G の濃度が一定になり、静置した場合にも約 4 時間で Gal-G 濃度が一定になった（Fig.13）。静置で抽出した場合、振とうした場合に比べ、上清液が明らかに澄んでいたことから、低温の水抽出 [4]と同様にタンパク質や多糖といった高分子の抽出をある程度抑制できると考えられる。以後の実験には、振とう（60rpm）1 時間後の上清液を用いた。種々の紅藻類から得られた Gal-G 濃度の比較を Fig.14 に示した。上清液の HPLC 分析の結果から、採取後に水で洗浄されて白くなったマクサ以外の全ての紅藻類において Gal-G の保持時間にピークが確認された。Gal-G は、紅藻類のフィコビリン系色素による光合成の代謝産物として紅藻デンプンと一緒に生産される [48]。このことから、色素の抜けた白いマクサについては、洗浄による Gal-G および光合成色素の損失から Gal-G を全く含んでいなかったと推察される。乾熱乾燥した後に生のオゴノリを使用したが、乾燥が不十分であったためか他の試料と比べ低い含有量を示した。採取時期が同じオゴノリにおいて、乾燥方法の違いによって Gal-G 含有量に大きな違いは見られなかった。マクサにおいて採取時期（2005～2007 年）の違いで含有量が変化しており、2007 年に採取された試料で最も高い濃度を示し、乾燥重量 1kg あたり約 40g の Gal-G が得られた。紅藻類への Gal-G の含有量については、*Porphyra* 属（アマノリ属）においてイソフロリドシドが 25-100g/kg-乾燥重量、フロリドシドが 10-60g/kg-乾燥重量で得られたという報告がある [44]。このことから、今回実験に使用した紅藻類からの Gal-G は、報告の範囲内の含有量であると考え

られる。しかし、Karsten らは、オーストラリアのシドニーにおいて 11 月の温かい時期に紅藻類 *Bangia atropurpurea* から約 500g/kg-乾燥重量で Gal-G を得ている [2)]。また、Simon-Colin らは、高塩分濃度（52ppt）の環境下に紅藻 *Grateloupia doryphora* を置き人工的にフロリドシドの含有量を高めた [49)]。このことは、紅藻類の種や採取場所、時期などの環境因子によって Gal-G の含有量が大きく異なることを示唆している。

1.3.3　紅藻類マクサからの Gal-G の精製

1.3.3.1　溶媒抽出におけるフェニルホウ酸（PhB）の添加効果

マクサ（2005 年採取）水抽出液の凍結乾燥物（薄黄色の粉末）20mg を蒸留水 1ml に溶解し、HPLC 分析から算出したところ、Gal-G の濃度 1.4g/l、純度約 7%であった。PhB を Gal-G との重量比で 5 倍まで添加したところ、アセトニトリル中の Gal-G の溶解度が 0.8g/l まで高くなった（Fig.15-a)。蒸留水に溶解した試料と比較して、約 60%の Gal-G が溶解することが分かった。また、測定した乾燥重量から算出した純度を Fig.15-b に示す。PhB 添加によりアセトニトリル中での Gal-G 濃度が高くなったのに対して、純度は徐々に低下していくことが分かった。PhB を抽出物との重量比 1:1 で添加した場合、最も高い純度で約 20%を示した。フェニルホウ酸添加において pH8.5 以上で糖の溶解度が上昇したとの報告 [32)]があり、ボンドエルート PBA（GL サイエンス社製）といった固相抽出担体などを用いて Gal-G を塩基性下で捕捉し、酸性下で放出する手法も考えられた。しかし、溶媒に対して精製前に存在する全ての Gal-G が溶解し、添加した PhB が除去できたと考えても純度約 50%までの上昇しか見込まれない。また、PhB 担体が高価なことなどを考慮し、より安価にラボスケールで大量精製を行える手法について検討した。

1.3.3.2　活性炭を用いた精製

Fig.16 は、活性炭に対する種々の糖類の吸着性を示す。二糖において活性炭 1kg あたりに最大で 100g の吸着が見られたのに対して、単糖においては 40g 程度であった。単糖よりもオリゴ糖の方が活性炭に対して高い吸着性を示す [33)]ことが知られていることからも、Gal-G においても同様に吸着できると考えられた。

活性炭を用いた精製により、Fig.2 の画分 A～F を得た。各画分の純度を算出した結果を

Table 3 に示す。精製前のマクサ水抽出液における Gal-G の純度は、14%であった。画分 A～C については、脱離する際のエタノール濃度を変え、純度に違いがあるかを調べた。その結果、エタノール濃度（8-70%）の違いによる Gal-G の純度への影響はないことが分かった。HPLC 分析により、Gal-G の減少量から活性炭への吸着量を算出したところ、70%エタノール 100ml でほぼ全ての Gal-G が脱離されることが確認された。そこで、画分 D～F について、脱離後の濃縮操作を容易にする目的も兼ねて、全て 70%エタノールを用いて脱離操作を行った。蒸留水による活性炭の洗浄操作での純度の向上を画分 D にて評価した。また、Gal-G よりも活性炭に対する吸着性の高い物質、例えばカロチノイドと思われる色素を少量の活性炭の添加により、Gal-G に先立ってに除去するために画分 E の評価を行った。画分 D、E は、どちらも 60%以上の純度を示し、画分 C（純度 39%）に比べて純度が高くなった。そこで、画分 D と E に対して行った操作を組み合わせた画分 F について評価した。画分 F における抽出物の純度は、精製前（純度 14%）と比較して純度 86%まで増加することが分かり、画分 D と E で行った活性炭の洗浄および着色物質の除去の操作が、活性炭を用いた Gal-G の精製に有効であることが示された。石原は、マクサ水抽出液から限外濾過、電気透析を用いて純度 85%で Gal-G を精製した [7]。このことから、活性炭を用いた手法でも同程度の純度まで精製できていることが確認された。また、画分 F を得る工程において、活性炭 10g に吸着された重量は約 0.2g であった。着色物質除去のため、活性炭 1g の添加と蒸留水による活性炭の洗浄が、Gal-G の損失を引き起こすことがある程度考えられるが、活性炭の添加量を増加することにより、さらに多くの Gal-G を一度に精製できることが見込まれる。本研究においては、操作 F により精製された Gal-G を用いた。

1.3.4　精製物の酸加水分解

Fig.17 は、精製された画分 F について酸加水分解を行い、種々の定量法により定量された濃度の経時変化を示す。反応時間の経過と共に Gal-G 濃度が減少し、ガラクトース量と還元糖量は増加した。酵素法およびフェリシアナイド法により定量されたガラクトース量と還元糖量は一致していた。DNS 法およびフェリシアナイド法による測定においても反応前の試料には還元性を示さず、このことは、還元性を示す夾雑物が含まれていないことを示している。精製前（純度 14%）の試料を加水分解前の試料は還元性を示し、酵素法で検出されたガラクトース量以上の還

元性物質が経時的に増加することを確認した。Gal-G を完全加水分解した後、ガラクトースとグリセロールを酵素法で定量すると、モル比 1:1 で結合していることが分かった。また、加水分解前に還元性を示さないことから、ガラクトースの還元性のあるアノマーの炭素に対してグリセロールが結合していると推測した。

1.3.5　TLC による加水分解物の分析

溶媒組成 n-ブタノール:エタノール:水（3:3:1）を用い、3 回多重展開により Gal-G の加水分解物の分離を行った（Fig.18)。標準物質として、ガラクトースと本研究室で得られた寒天オリゴ糖（主成分 2 糖）を用いた。加水分解前には、二糖（Rf 値 0.74）とガラクトース（Rf 値 0.55）の間に Gal-G (Rf 値 0.63）と思われる単一のスポットが検出された。Gal-G の加水分解物においてガラクトースと同じ Rf 値のスポットが経時的に増加するのに対し、Gal-G が減少していくことが確認された。この論文中にはデータを示していないが、ナフトレジルシノールにおいてもガラクトースと同様に紫色の呈色を確認した。このことから、アニスアルデヒド試薬およびナフトレゾルシノールを用いることにより、Gal-G の検出が行えることを確認した。

1.3.6　Gal-G の消化性

種々の酵素によるフロリドシドの消化実験の結果を Table 4 に示した。分解活性を示した酵素に negative(−)、示さなかった酵素に positive(+)を示した。分解実験に使用した酵素の活性の確認をマルトース、リパーゼキット S、ラクトース、寒天を用いて行った。セルラーゼ及びメイセラーゼ 10g/l で高濃度ではあるが、グルコース骨格を有していないフロリドシドに対して分解活性が確認された。また、メイセラーゼにおいて今回の実験条件で完全加水分解されることを確認した。セルラーゼは、セルロースのβ-1,4 結合を切断する酵素であり、フロリドシドに対して働くことは考え難い。今後、精製酵素を用いて分解の特性について解明する必要がある。リパーゼにおいても使用したうち、リパーゼ A およびニューラーゼ F3G でフロリドシドの分解が確認された。竹中らは、α型のグルコシルグリセロールにおいて、α-グルコシダーゼで分解され、β-グルコシダーゼ（エムルシン）では分解されないことを報告している[8]。α-Gal-G においても同様の結果が考えられるため、粗酵素であるもののβ-ガラクトシダーゼで分解されなかったと考

えられる。また、粗酵素であるが、寒天分解酵素（α β-アガラーゼの混合）でもフロリドシドが分解されないことが分かった。

1.3.7　Gal-G の機能性の評価

Gal-G の生理活性試験の結果を Table 5 に示した。酵素に対して影響を与えた生理活性試験について negative(−)、与えなかった試験に positive(+)を示した。試験の結果、α-アミラーゼ、α-グルコシダーゼにおいて活性を見出したため、濃度を変化させ追実験を行った。フロリドシドのメイラード反応性およびα-アミラーゼの活性化は、合成物の結果と共に Fig.29 と Fig.33 に示した。

α-グルコシダーゼ阻害試験の結果を Fig.19 に示した。試験において、p-ニトロフェノールの吸光度に対して各試料が影響しないことを確認した。フロリドシドにおいて 4g/l でα-グルコシダーゼを約 20%程度阻害することが分かった。また、ガラクトース、ラクトースでも 4g/l でα-グルコシダーゼを同程度阻害することが確認された。このことから、フロリドシドの構成糖であるガラクトースによる阻害効果または、今回の試験濃度では糖の種類に関わらずα-グルコシダーゼに対して阻害効果を示すことが示唆された。

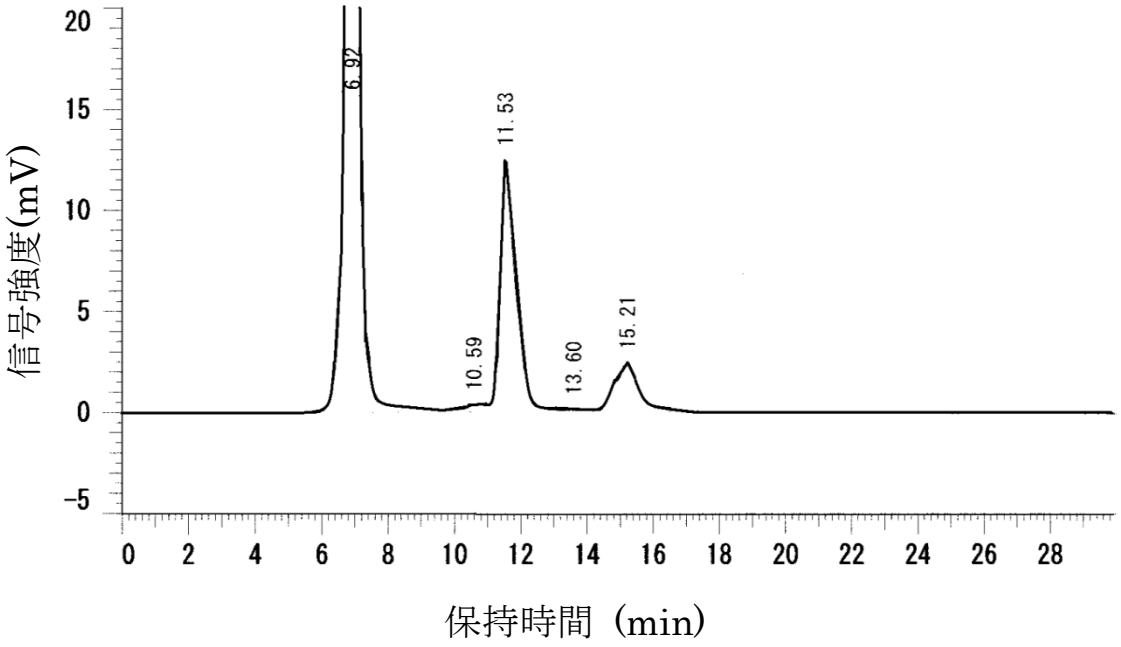


Fig.3　マクサ水抽出液の HPLC クロマトグラム
(カラム：SugarKS-802)

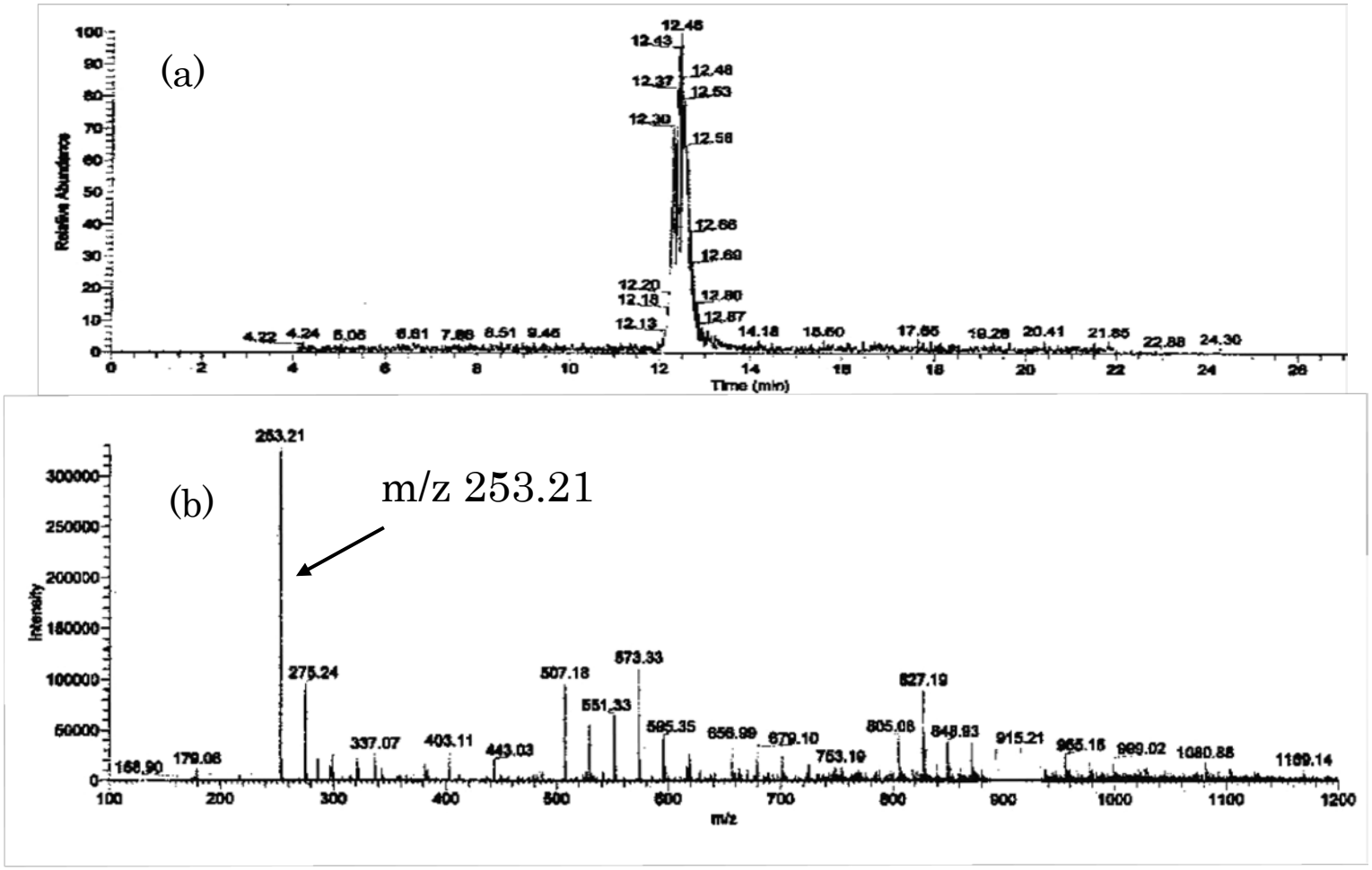


Fig.4　マクサ抽出物の LC-MS クロマトグラム及びスペクトル

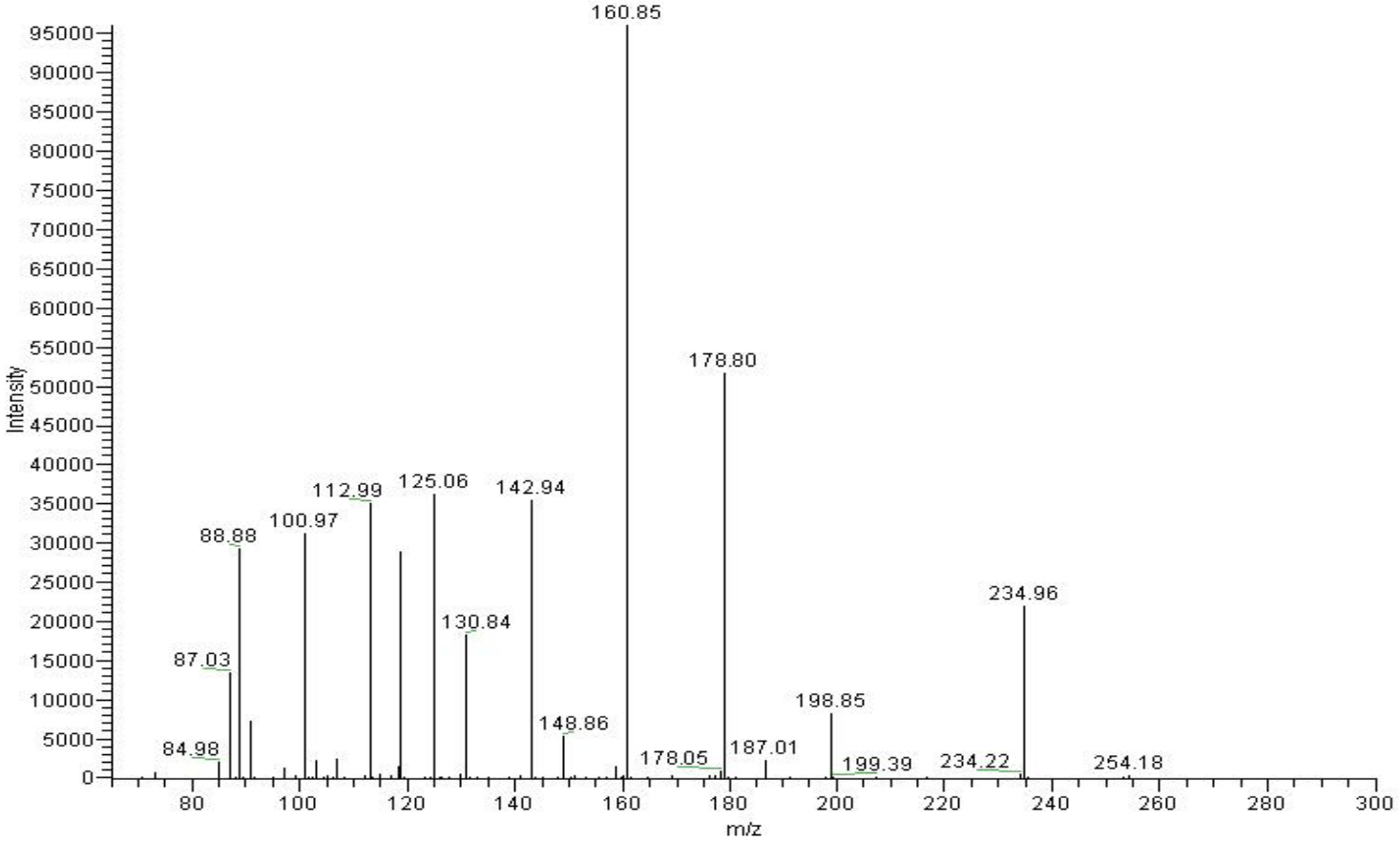


Fig.5　マクサ抽出物（m/z253）の MS/MS スペクトル

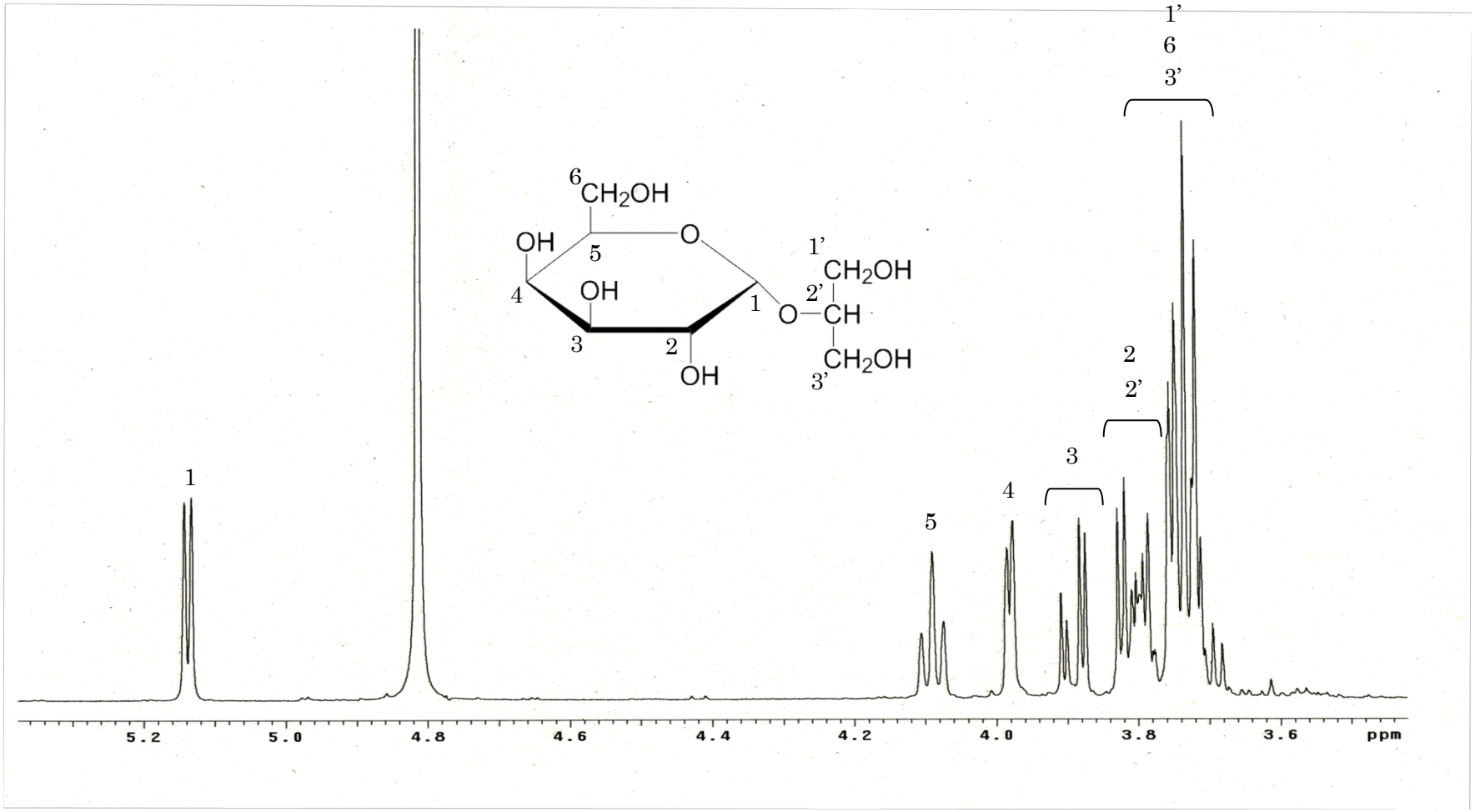


Fig.6　マクサ抽出物の ^{1}H NMR スペクトル

Table 1　マクサ抽出物と Gal-G の ^{1}H 化学シフト

化合物	化学シフト (ppm)								
	ガラクトース残基						グリセロール残基		
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-1'	H-2'	H-3'
フロリドシド [45] (2-O-α-Gal-G)	5.14	3.82	3.90	3.99	4.09	3.74	3.76	3.81	3.78
D-イソフロリドシド [44] (1-O-α-Gal-R-G)	4.94	3.78	3.82	3.92	3.88	3.68	3.41-3.44	3.88	3.52-3.55
L-イソフロリドシド [44] (1-O-α-Gal-S-G)	4.93	N.D.					3.75	N.D.	3.62
マクサ抽出物	5.14	3.82	3.89	3.99	4.09	3.72-3.81	3.72-3.81	3.79	3.72-3.81

N.D. ; データなし

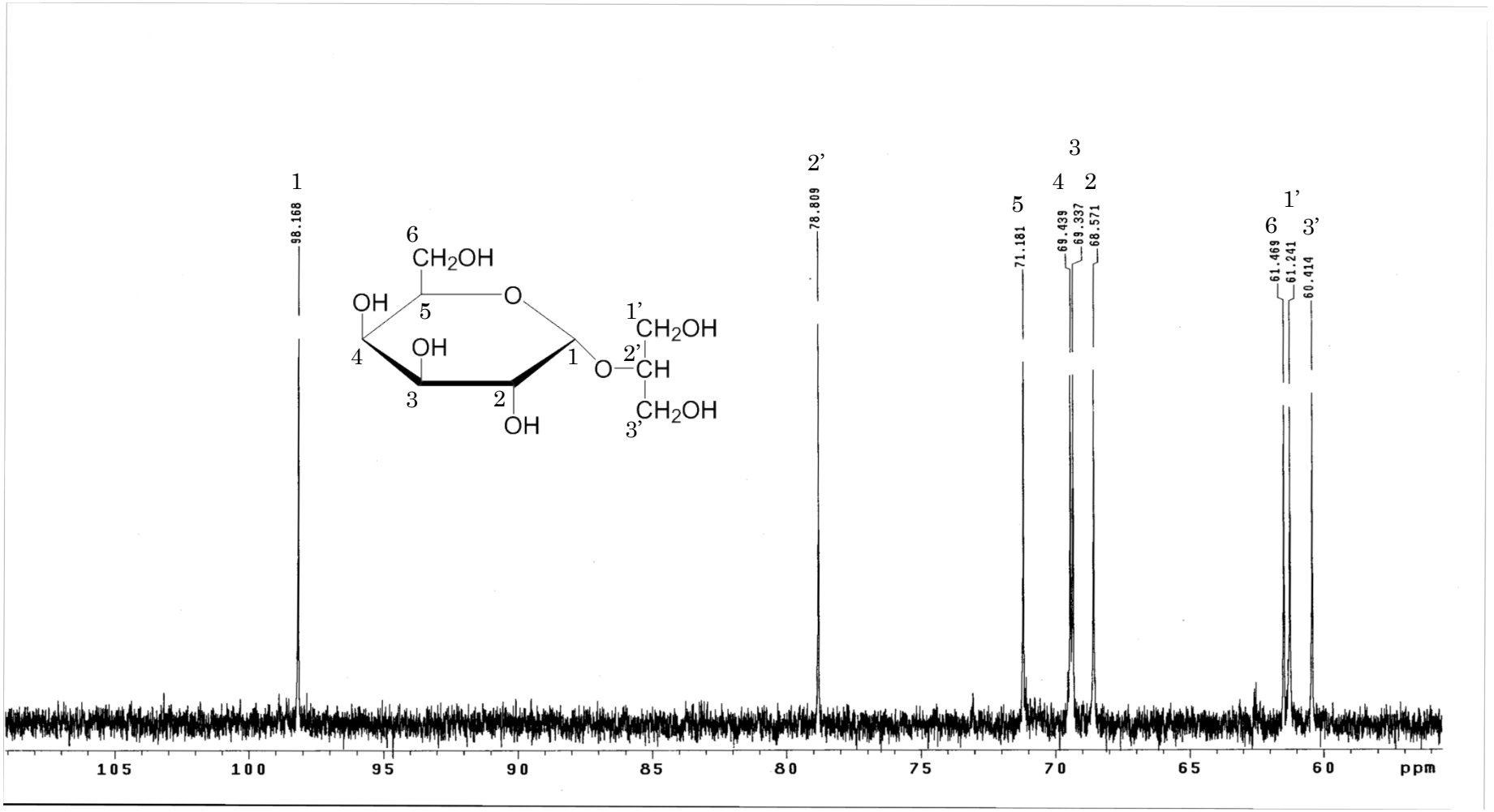


Fig.7　マクサ抽出物の ^{13}C NMR スペクトル

Table 2　マクサ抽出物と関連化合物の ^{13}C 化学シフト

化合物	化学シフト（ppm）								
	ガラクトース残基						グリセロール残基		
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'
フロリドシド[44] (2-O-α-Gal-G)	99.2	69.6	70.5	70.4	72.2	62.3	62.5	79.9	61.5
L-イソフロリドシド[44] (1-O-α-Gal-S-G)	99.6	69.8	70.6	70.4	72.1	62.3	71.6	69.8	63.7
D-イソフロリドシド[44] (1-O-α-Gal-R-G)	99.9	69.6	70.6	70.4	72.1	62.3	71.8	70.1	63.7
α-Galactose[44]	93.2	69.4	70.2	70.3	71.4	62.2			
Glycerol[44]							63.8	73.3	63.8
マクサ抽出物	98.2	68.6	69.4	69.3	71.2	61.2	61.5	78.8	60.4

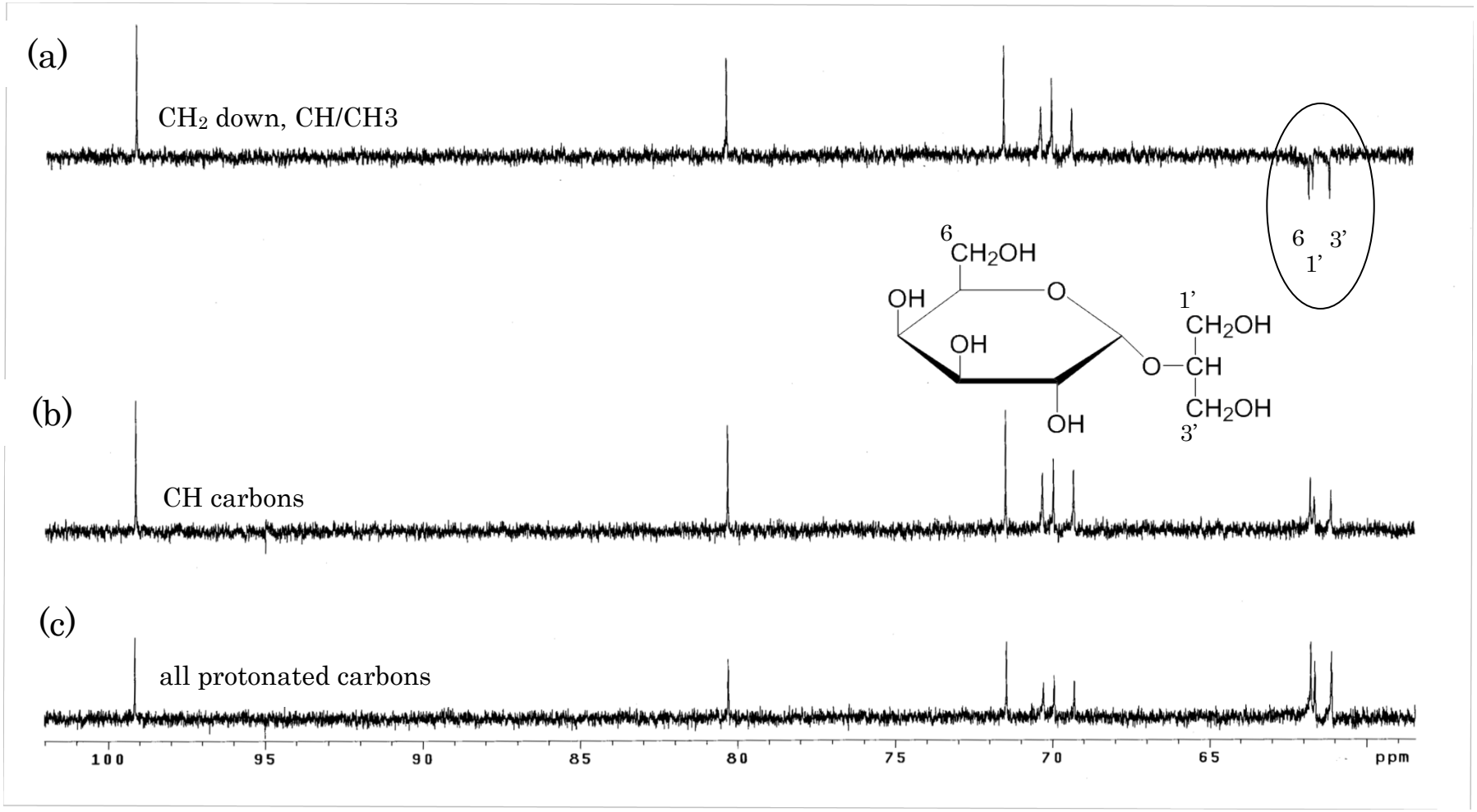


Fig.8　マクサ抽出物の DEPT135 スペクトル

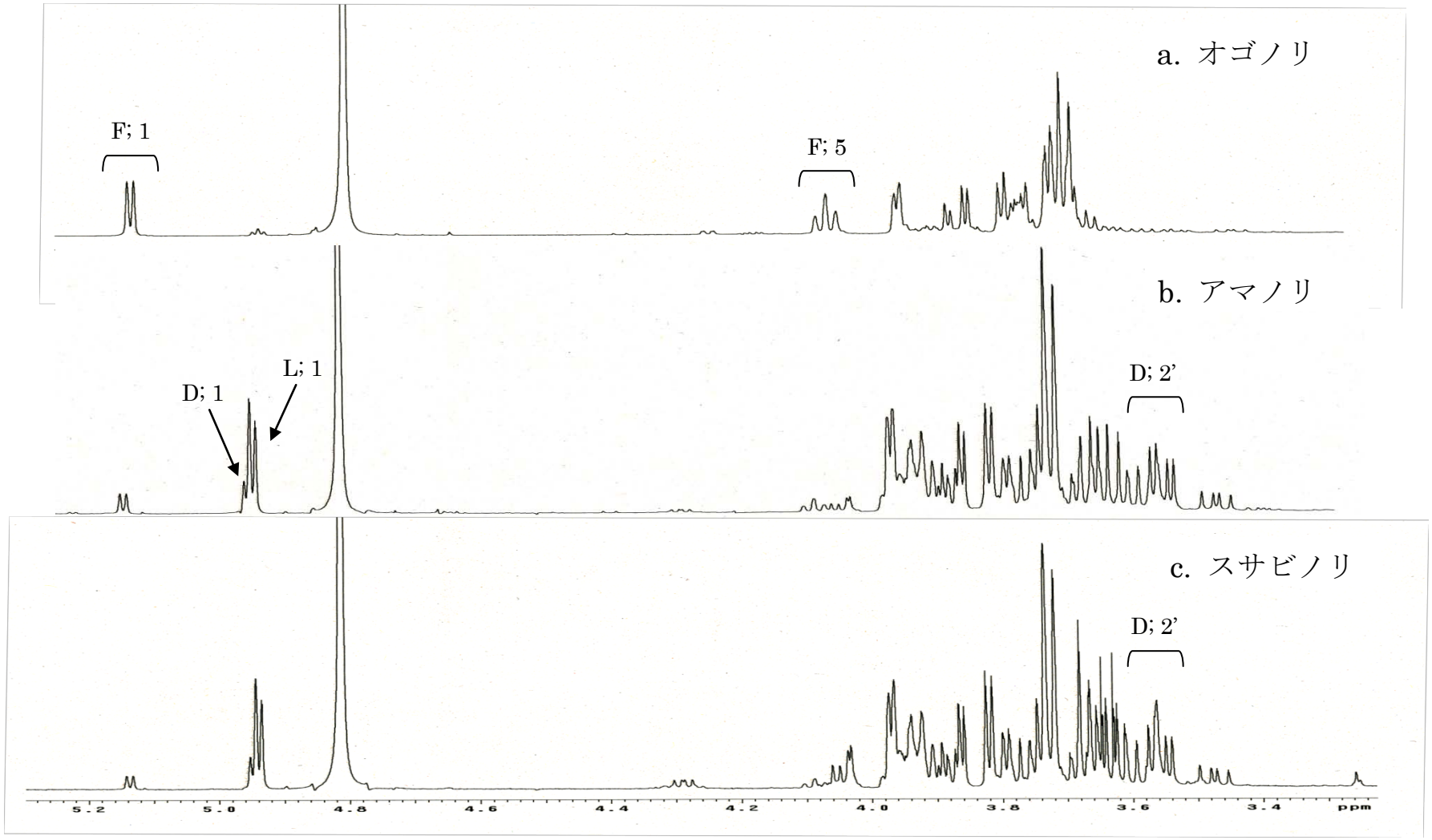


Fig.9　種々の紅藻類からの抽出物の ^{1}H NMR スペクトル

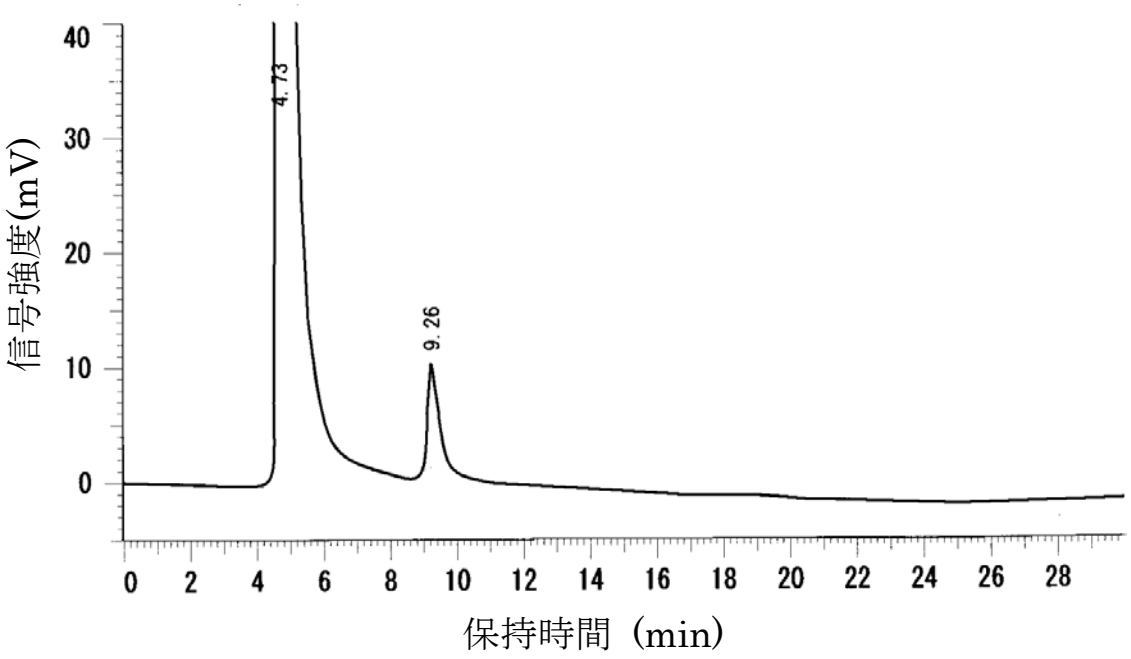


Fig.10　精製物（画分 F）の HPLC クロマトグラム
(カラム：NH_2-1251-N)

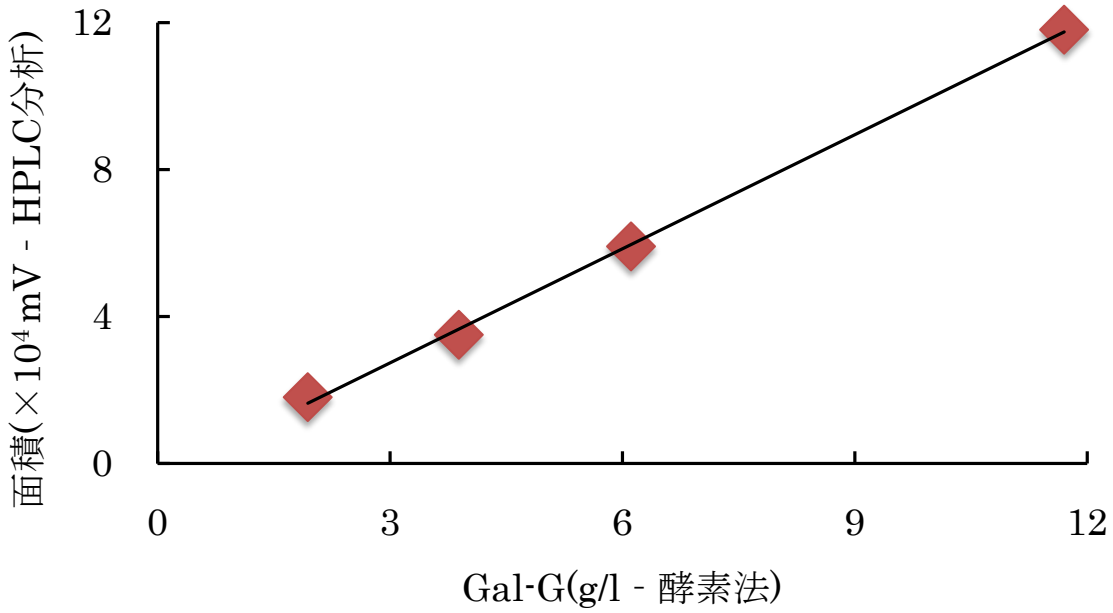


Fig.11　Gal-G の検量線

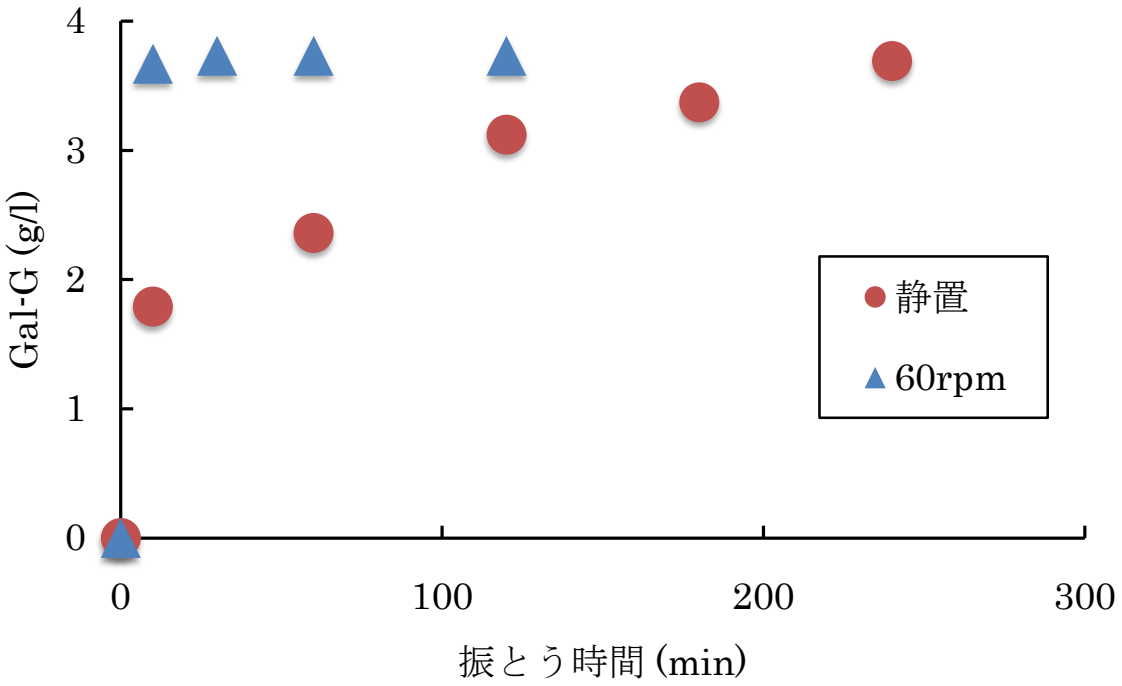


Fig.12　Gal-G の抽出条件の検討

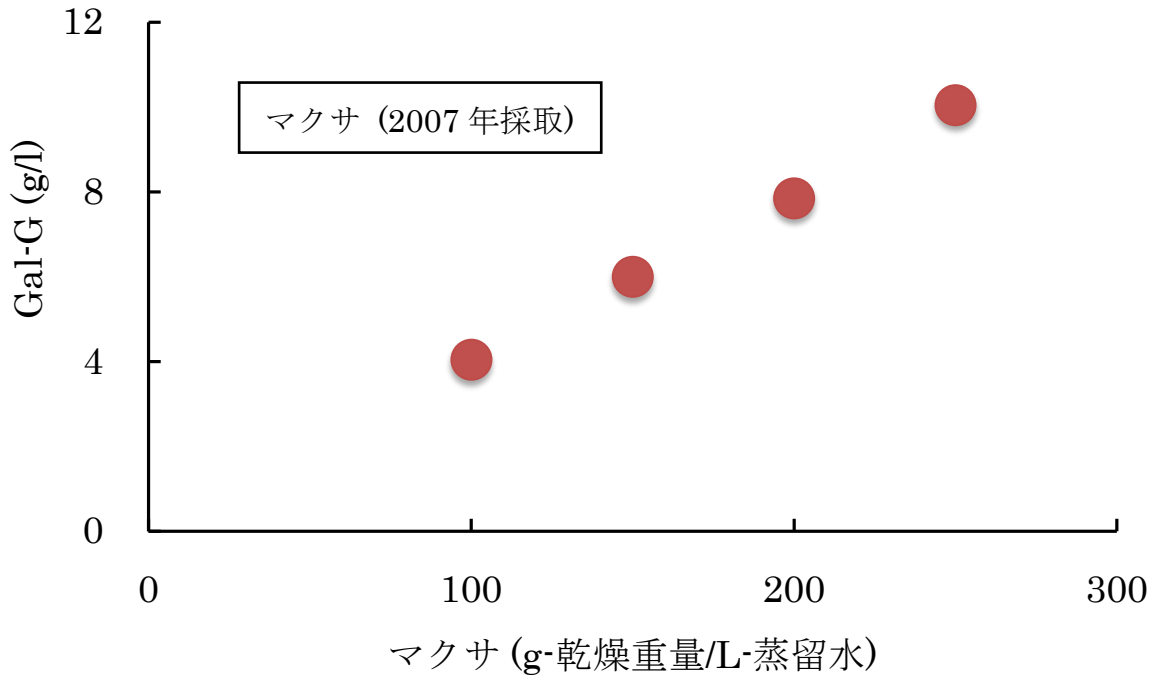


Fig.13　マクサから Gal-G の抽出濃度

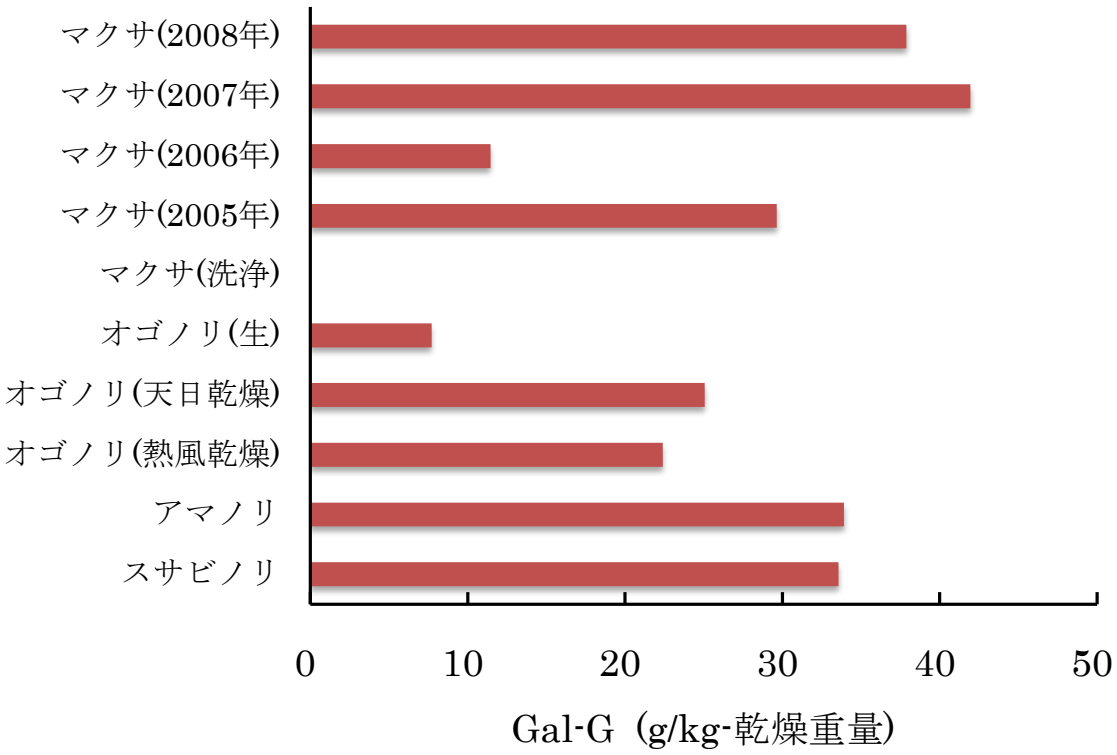


Fig.14　各種紅藻類からの Gal-G の比較

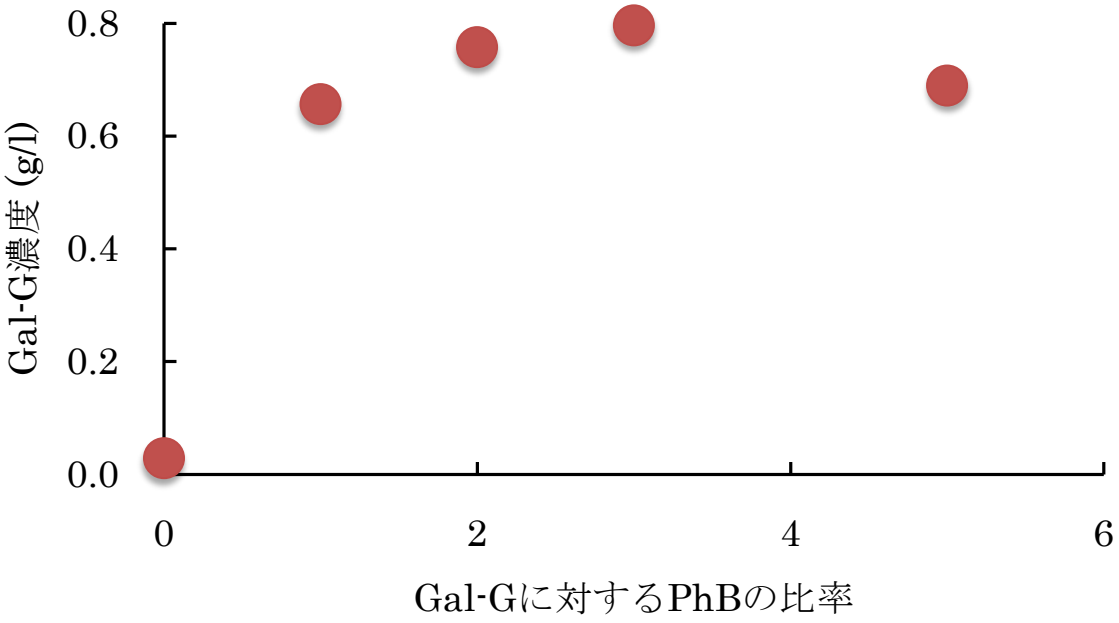


Fig.15-a　Gal-G の溶解性に対する PhB 添加の影響

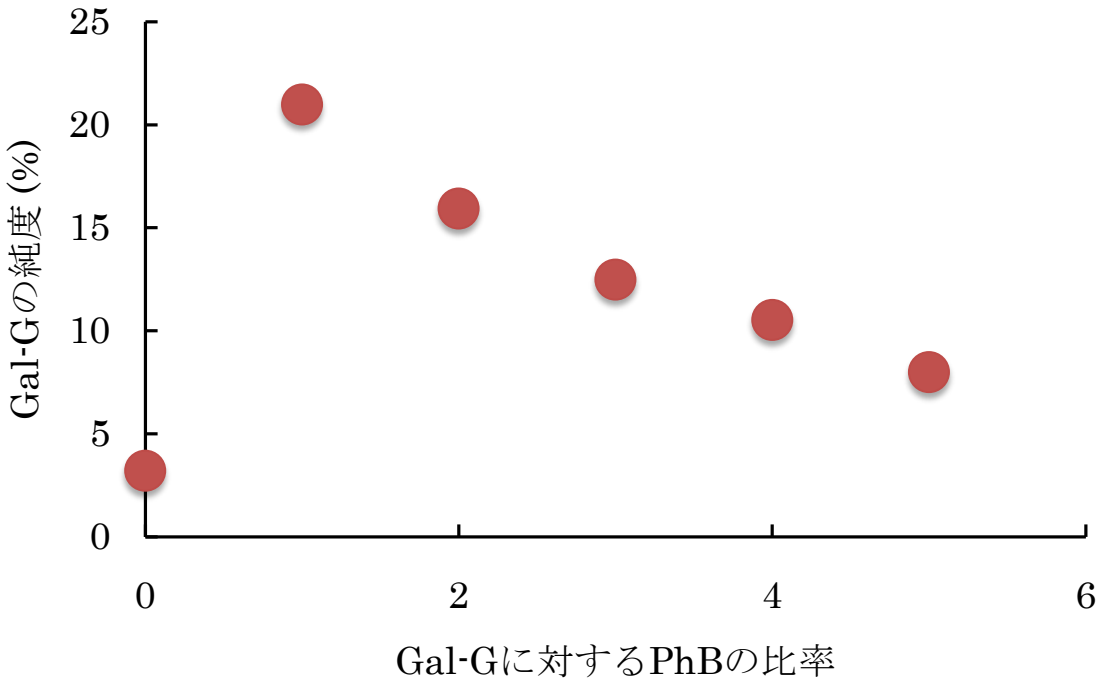


Fig.15-b　Gal-G の純度に対する PhB 添加の影響

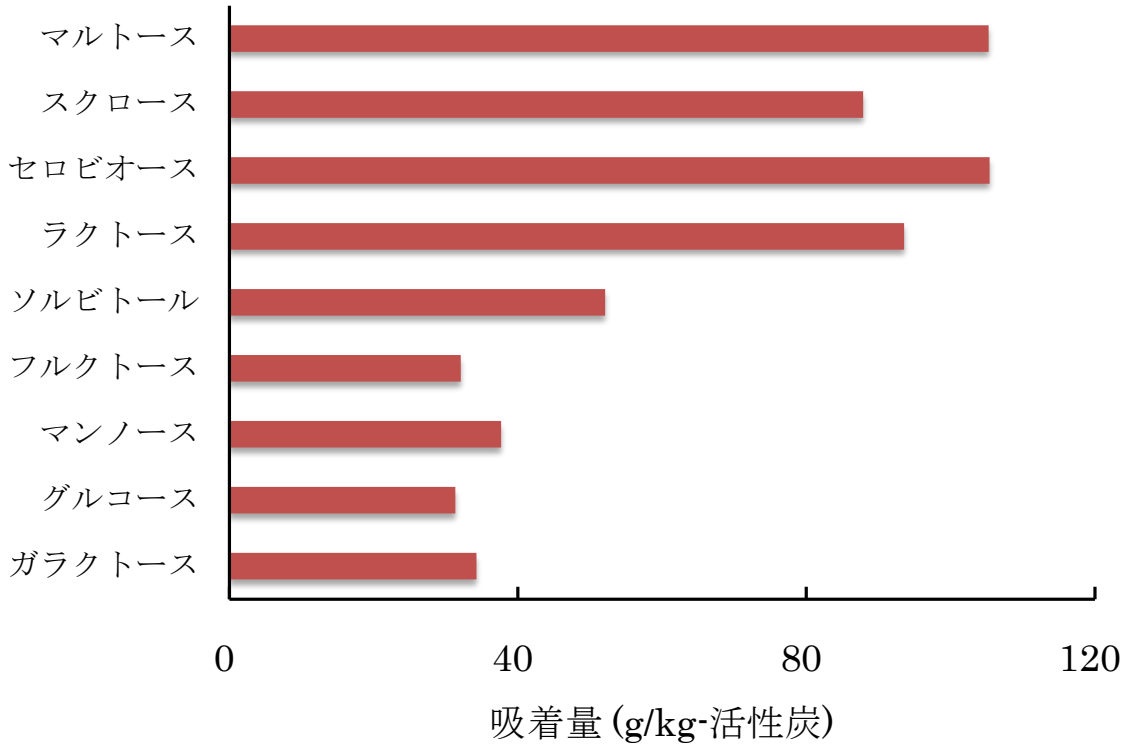


Fig.16　活性炭に対する各種糖類の吸着性

Table 3　各分画における Gal-G の純度

		純度(%)
精製前	上清液	14
画分	A	39
	B	41
	C	39
	D	68
	E	64
	F	86

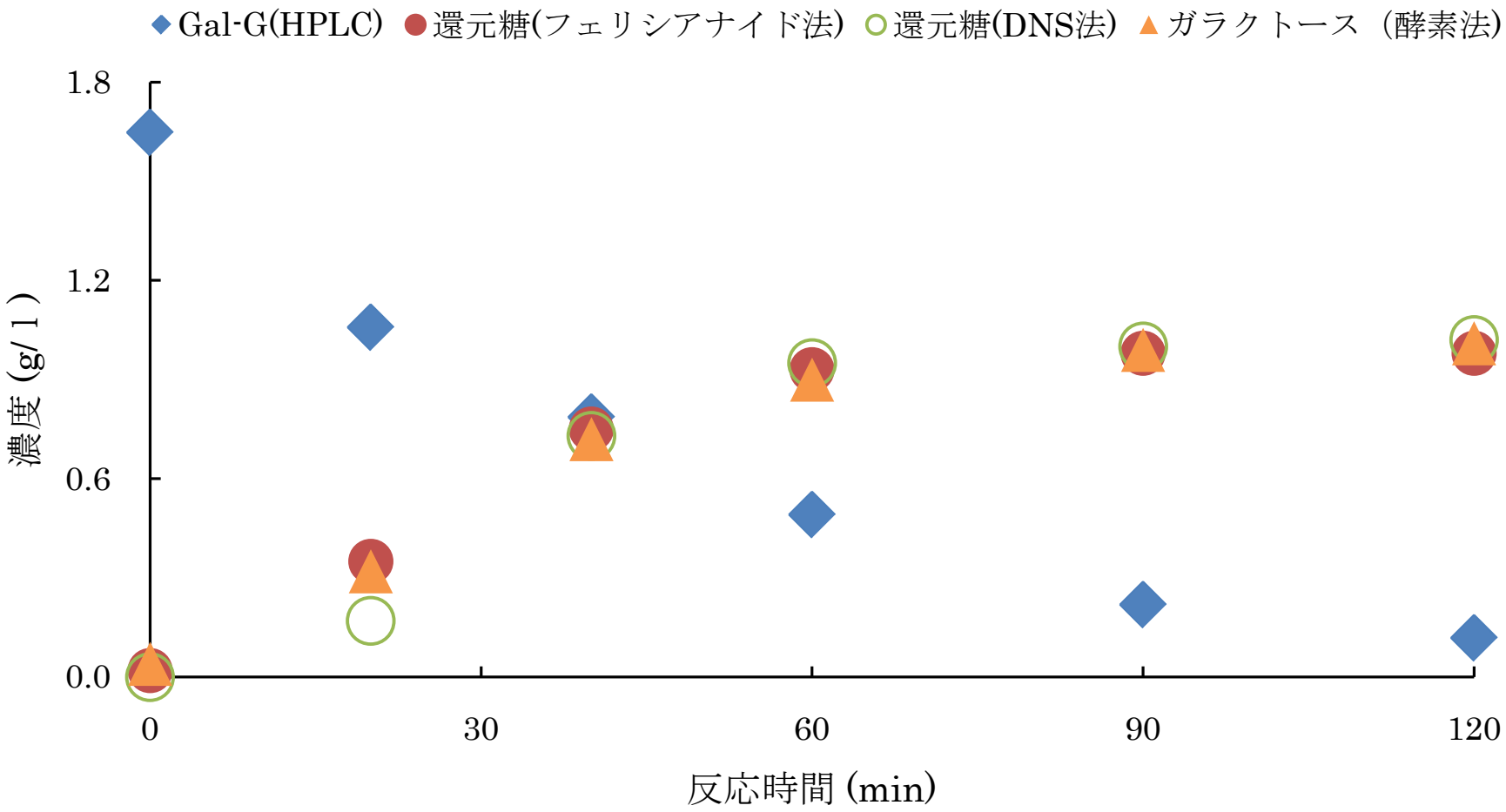


Fig. 17　Gal-G の加水分解における濃度の経時変化

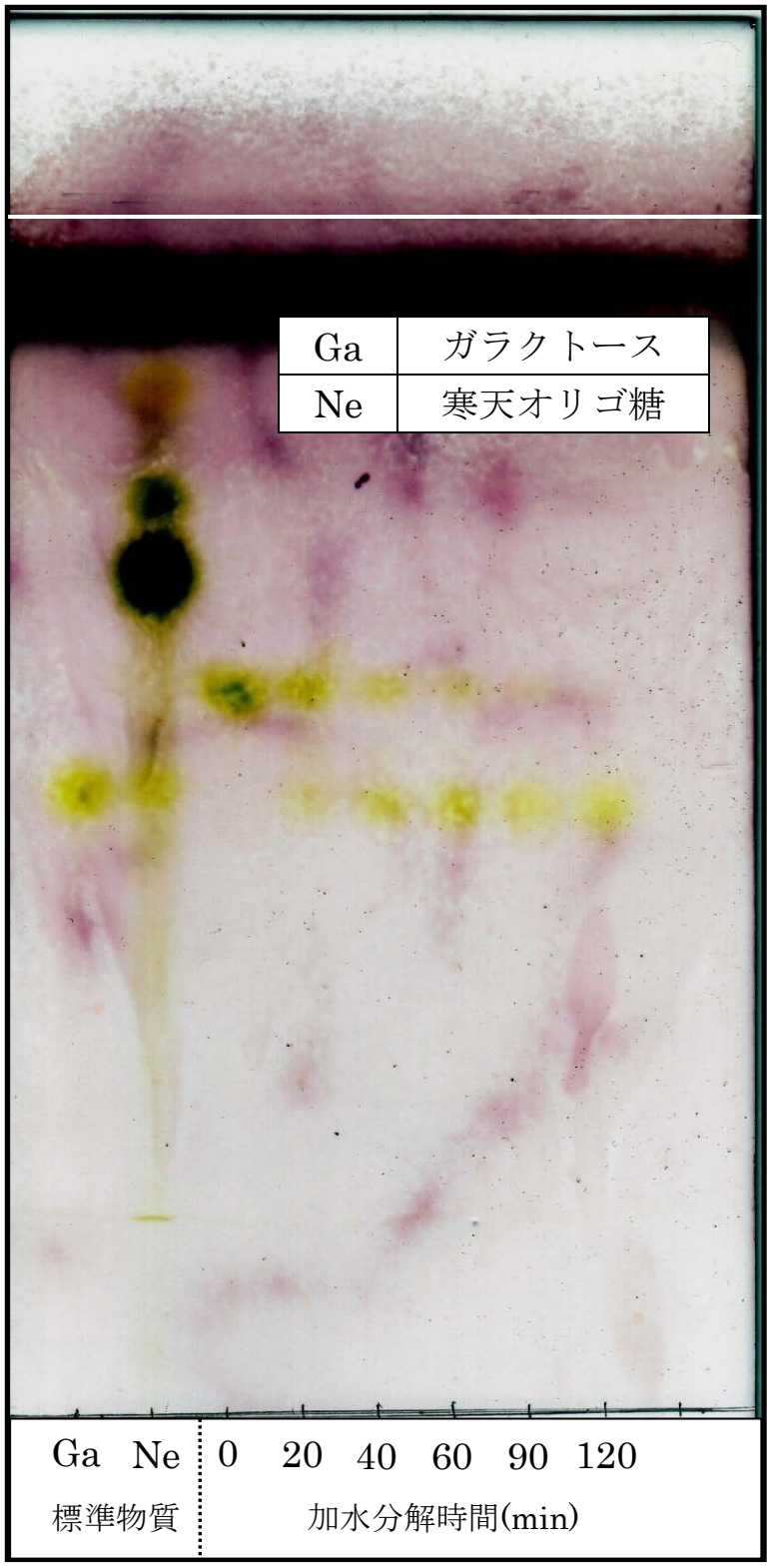


Fig.18　加水分解物の TLC クロマトグラム

Table 4　α-Gal-G の消化試験

酵素	分解活性
メイセラーゼ（明治製菓社製）	−
セルラーゼ（Wako 社製）	−
リパーゼ A	−
ニューラーゼ F3G	−
リパーゼ G	＋
リパーゼ R	＋
リパーゼ AY	＋
リパーゼ PS	＋
大腸菌由来 β-ガラクトシダーゼ（粗酵素）	＋
寒天分解酵素（粗酵素）	＋

分解活性; negative(−)、positive(＋)

Table 5　種々の生理活性試験へのフロリドシドの影響

試験	試験濃度(g/l)	活性
α-アミラーゼ	5	−
α-グルコシダーゼ	4	−
β-ガラクトシダーゼ	5	＋
SOD 様	1	＋
チロシナーゼ	5	＋
ACE	5	＋
セルラーゼ	5	＋
リパーゼ	5	＋
抗菌性	5	＋

活性; negative(−)、positive(＋)

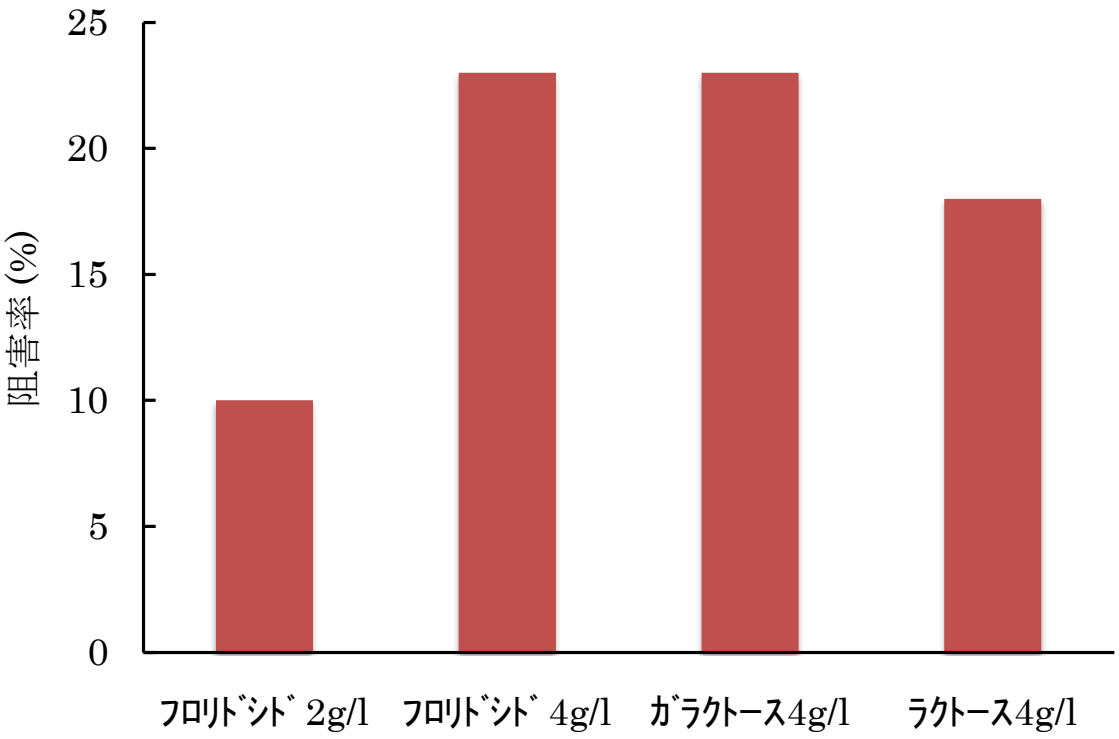


Fig.19　α-グルコシダーゼの阻害

2 章　グリコシルグリセロールの簡便な合成とその特性

※紅藻類マクサから同定された Gal-G について、合成 Gal-G との混同を避けるため、本章においては全てフロリドシドと記載する。

2.1 目的

ガラクトースまたはグルコースと脂肪族アルコールを酸触媒下で反応させ、グリコシド類を得る手法に関して、工業的に利用できる特許がいくつか存在する[50-51]。しかし、それらの報告の中にエチレングリコールやグリセロールといった多価アルコールを用いて合成を行った例はない。そこで、同様の手法を用いて多価アルコールや糖アルコールを反応物としてグリコシド類の合成を試みた。本研究では、ガラクトースとグリセロールをモデル反応系として、反応条件及び合成物の精製法について検討した。グリセロールに糖類を溶解させて合成反応を行うため、反応後、反応系に水を添加し、活性炭により精製した。また、有機溶媒を用いた抽出法についても検討した。精製により得られた成分の構造分析を推定するため、酸加水分解、TLC、質量分析を行った。酵素法による位置特異的な合成や有機化学的に立体特異的に合成する手法とは異なり、本章に示す手法では、糖のアノマー炭素への結合性及びグリセロールの水酸基への置換位置の違いによっていくつかの異性体の生成が考えられる。そこで、シリカゲルクロマトを用いた異性体の分離を試みた。さらに分離した試料について NMR 分析及び、Gal-G の機能性について評価を行い、天然から得られた Gal-G と比較した。

2.2 実験方法

2.2.1　糖と多価アルコールまたは糖アルコールとの合成方法及び反応性の評価

公開特許文献[50-51]を参考にして以下のように操作を行った。原料の糖類として、Wako 社製の D-ガラクトース、D-グルコース、D-ソルビトール、SIGMA 社製の D-マンノース、L-ラムノース、2-デオキシ-D-グルコース（Grade Ⅱ）、D-キシロース、D-フルクトース、スクロース、D-マルトース（水和物、Grade Ⅰ）、ラクトース（水和物)、D-セロビオースを用いた。アルコール類として、SIGMA 社製のグリセロール、キシリトール、meso-エリスリトール、Wako 社製のエ

チレングリコール、D-ソルビトールを用いた。反応温度に加温したアルコール類 1ml に対して、原料の糖類 0.1g を添加し、溶解したことを目視で確認した。その後、酸触媒としてリン酸を添加し、ヒートブロックを用いて開放系で反応を行った。反応条件の詳細を結果と共に Table6～8 に示した。

反応溶液 100μl を採取して蒸留水 1ml に溶解し、2N 水酸化ナトリウムを用いて pH4～7 の範囲に調整した。HPLC 分析において、ODS カラムの特性に従って原料に用いた糖類とアルコール類よりも大きい分子量と推測される保持時間のピークを調べた。触媒無添加の場合の反応液についても同様の操作を行い、合成物の有無を確認した。

2.2.2　糖類とグリセロールの反応性の比較

合成のため、糖類として、ガラクトース、グルコース、マンノース、ラムノース、デオキシグルコースを用いた。ホットプレートスターラー上で加温したグリセロール 100ml に対して 5g の割合で各糖類を添加して溶解させた。触媒としてリン酸を 20μl/100ml-グリセロールの濃度になるように添加した。開放系で撹拌しながら所定時間反応を行い、反応中の温度を水銀温度計により 10 分毎に計測し、温度調節した。HPLC 分析を行い、原料の糖に対する収率を算出した。

2.2.3　Gal-G 合成における反応条件の検討

ガラクトース 5g とグリセロール 100ml を用い、反応温度（86-137℃）と触媒量（リン酸 2-200μl）の Gal-G 生成量に対する影響を調べた。

2.2.4　活性炭を用いた精製

反応終了後、反応溶液 100ml を蒸留水 2L に添加して溶解させ、活性炭 100g を添加して室温で 1 時間振とうした。吸引ろ過（ガラス繊維ろ紙 GA-200、ADVATEC 社製）によって活性炭を回収し、蒸留水 3L により活性炭を洗浄した。その後、70%エタノール 500ml を添加し、Gal-G の脱離を行い、50℃のウォーターバス中で加温しながら空気を送風し濃縮した。適宜希釈した後、HPLC 分析により Gal-G を測定した。

2.2.5　有機溶媒を用いた抽出法の検討

抽出用の試料として、ガラクトース 5g とグリセロール 100ml を反応させた（反応温度 116℃、リン酸 20μl）後、3 時間毎にガラクトース 5g を 3 回添加し、合成した Gal-G を用いた。溶媒として、メタノール、エタノール、n-ブタノール、ジエチルエーテル、ヘキサン、アセトン、アセトニトリルについて検討した。反応溶液中に含まれる Gal-G とグリセロールの溶媒への溶解性を調べ、実験に用いる溶媒の選択を行った。反応終了後、反応液 2ml を溶媒 8ml に添加し、密栓して 37℃で 3 時間振とうした後、一昼夜冷凍庫（-20℃）に保存した。上清液を除去し、沈殿物を蒸留水に溶解し、適宜希釈した後、HPLC 分析を行った。Gal-G の回収率を向上させるためアセトンに対して体積あたりヘキサンを 20%混合し、同様の実験を行った。

2.2.6　酸加水分解

5g/l に調製した Gal-G 5ml を塩酸濃度 0.3M として沸騰水中で加水分解を行った。経時的に試料を採取し、0.3M 水酸化ナトリウムで中和した。加水分解によって生じたガラクトース量をガラクトースデヒドロゲナーゼを用いた酵素法およびフェリシアナイド法により測定した。また、加水分解前の試料と完全加水分解した試料（180min）については、F-キットグリセリン (Roche Diagnostics GmbH 社製) を用いてグリセロールの定量を行った。

2.2.7　分析方法

2.2.7.1　薄層クロマトグラフィー

分析には、シリカゲル 60 プレート（Merck 社製）を用い、展開溶媒として n-ブタノール:エタノール:水（3:3:0.5）混合液を用いて展開を行った。展開後、50%硫酸を噴霧し、120℃のホットプレートで加熱した。

2.2.7.2　シリカゲルクロマトグラフィー

充填剤にはワコーシル C-200 (64～210μm、Wako 社製)、カラムとして液体クロマトカラム ILC-A11-300（内径 11mm、長さ 300mm、桐山社製）を用い、溶離液として n-ブタノー

ル:エタノール:蒸留水（3:3:0.5）混合液を用い、流速 1.0ml/min、ループ長 1ml で分離を行った。分析試料として、ガラクトースとグリセロールのモル比 1:100 で合成した Gal-G（反応温度 116℃、リン酸量 20μl）を用いた。フラクションコレクターにて 2 分間隔で分画を行い、回収した画分約 2ml の溶離液を減圧除去（80hPa、60℃）し、シロップ状の物質の存在から分画範囲を目視で確認した。蒸留水 0.5ml を添加して内容物を溶解し、参照物質として合成した Gal-G を用いて TLC 分析を行った。展開溶媒として n-ブタノール:エタノール:水（3:3:0.5）混合液を用い、検出には、50%硫酸を展開後のプレートに噴霧し、120℃のホットプレート上で加熱した。以上の操作を繰り返し得られた濃縮水溶液画分をフィルターろ過（0.45μm）した後、蒸留水を減圧除去（70hPa、50℃）し、NMR 分析の試料とした。

2.2.8 機能性試験

2.2.8.1　Gal-G と Glu-G の消化性

既報に従って以下のように実験を行った [9]。生体内での消化性を評価するために、ヒトの唾液中のα-アミラーゼ（自らの唾液)、人工的な胃酸として塩酸-塩化カリウム緩衝液、豚の膵臓由来α-アミラーゼ（α-アミラーゼ試験と同じ)、ラット腸管アセトン粉末（Sigma 社製）を用いた。口腔内を水道水でよく洗浄し、蒸留水でうがいをした後、唾液を回収して 0.45μm フィルターでろ過して使用した。25mM リン酸緩衝液（pH7.0）0.8ml に 5g/l の Gal-G0.2ml を加え、4unit/ml α-アミラーゼ 100μl またはヒトの唾液 100μl を加えて 37℃で 24 時間加温した。50mM 塩酸-塩化カリウム緩衝液（pH2.0）250μl に 5g/l Gal-G 500μl を加えて 37℃で 24 時間加温した。ラット腸管アセトン粉末 1g を 0.9%塩化ナトリウム 20ml に懸濁し、3 分間超音波処理した後、遠心分離（3,000rpm、30min）して得られた上清液を酵素溶液として使用した。5g/l Gal-G を含む 50mM ナトリウム-マレイン酸緩衝液（pH6.6）1ml へ酵素溶液 100μl を添加して 37℃で 24 時間加温した。塩酸-塩化カリウム緩衝液（pH2.0）で処理した試料を水酸化ナトリウムで中和し、その他の試料を沸騰水中で 3 分間加熱し、遠心分離（8,000rpm、3min）した後、HPLC 分析を行った。緩衝液無添加と酵素無添加の場合をコントロールとして各試料の Gal-G に対する消化性を評価した。また、1.2.7.11 に示した酵素についても同様に試験を行った。

2.2.8.2　加熱安定性・加熱着色性

既報に従って以下のように試験を行った[43]。1%糖類（Gal-G、グルコース、ガラクトース、スクロース）を含む 20mM クエン酸-リン酸緩衝液（Mcllvaine 緩衝液）pH4 と pH7 をそれぞれ密栓し、160℃で 60 分間加熱した。その後、蒸留水で適宜希釈して吸光度 420nm で測定した。加熱処理後、溶液に残存する糖類を HPLC によって分析して加熱安定性について評価した。

2.2.8.3　う蝕原性

既報に従って以下のように試験を行った[9]。口腔内を水道水でゆすぎ蒸留水でうがいした後、唾液を回収した。1%の試料（蒸留水、グルコース、ガラクトース、スクロース、Gal-G、Glu-G）1ml へ、新鮮な唾液 3ml とブレインハートインフュージョン培地（取扱説明書に従って調製、Fluka 社製）1ml を加えた。混合液を 37℃で加温し、経時的に pH 変化を測定することでう蝕性を評価した。

2.3　結果と考察

2.3.1　糖と多価アルコールまたは糖アルコールとの反応性の評価

糖と多価アルコールまたは糖アルコールとの反応性について Tabale 6～8 に示した。HPLC 分析より反応性の確認された試料に原料の糖に対して算出した収率(%)または positive(＋)、確認されなかった試料に negative(－)を記した。また、還元性を持つ糖に positive(＋)、非還元糖に negative(－)を記した。Table 6 は、種々の糖類とグリセロールとの反応性を示す。セロビオース以外の糖類においてはグリセロールに対して完全に溶解することを目視で確認した。反応液の HPLC 分析の結果から、グルコース、ガラクトース、マンノース、ラムノースにおいて合成物と思われる保持時間にピークを検出した。原料の糖に対して算出した収率を比較したところ、ガラクトースで最も高く、グルコースで最も低い収率を示した。反応性を糖分子全体の構造で考えた場合、全ての置換基がエクアトリアル配位した構造をとるグルコースの安定性が最も高い[52]。グルコースと 2 位のエピマーであるマンノースでは、アキシアル配位である 2 位の水素と 4 位の水素との立体障害が考えられる。また、グルコースと 4 位のエピマーであるガラクトースでも、4 位の水素と 2 位の水素との立体障害が考えられる。このことから、ラムノースに関してはメチル

基を持つため比較を行えないが、ガラクトース、グルコース、マンノースで比較した場合、グルコースが最も安定で反応性が低いことが推測される。また、糖が還元性を持つためには、直鎖構造をとることにより生じるアルデヒド基またはケトン基の存在が必要である。水溶液中での直鎖構造のアルデヒド型の存在比は、グルコース（0.024%)、マンノース（0.064%)、ガラクトース(0.082%）と報告されている [52]。グリセロール中での存在比にこの数値と同じかは不確かであるが、直鎖構造の割合も収率の違いに何らか影響を与えているのではないかと推察した。2-デオキシグルコースに関して Table 6 に示した反応条件でグリセロールと合成を行なった場合、反応後に残存する 2-デオキシグルコースに反応副産物と思われるショルダーピークが見られため、収率の算出は行えていない。しかし、同条件でグルコースの収率（12%）と比較した場合、明らかに高い反応性を示した。2-デオキシグルコースで反応性が高くなったことは、糖分子自体が不安定になったもしくはアノマー位の立体障害が少なくなったことが要因として考えられる。合成物についてはこれ以降、Table 6 に示した略号で示す。二糖やキシロース（五単糖）においては、5 日間の反応でもグリセロールと反応性を示さないことが分かった。また、原料の糖よりも低分子量側に HPLC 分析でピークを示すことから二糖の分解など目的の反応以外が進行していると思われた。ガラクトースとグリセロールの反応における経時変化の HPLC クロマトグラムを Fig.20-a～c に示した。反応時間の経過と共に、ガラクトースが減少し、合成物と思われる保持時間 11.5min にピークを検出した。反応終了後の HPLC 分析（Fig.20-c）から、紅藻類のマクサから得られた Gal-G のピークの保持時間（Fig3）に一致するピークを示すことを確認した。本章に示す合成法において糖に対してアルコールの量が少ない場合、縮合物を生じることが報告されている [51]。このことから、Fig14-c で保持時間 10.4min に見られるピークは、合成における縮合物と考えられる。データを示していないが、モル比 1:1 のガラクトースとグリセロールを Table 6 に示した条件で反応させた場合、反応液の HPLC 分析で保持時間 10.5min、9.9min にピークを検出した。

糖とエチレングリコールの反応性を Table 7 に示した。HPLC 分析より合成物と思われる保持時間にピークを検出した。糖とグリセロールの反応性（Table 6）の結果と同様に、グルコースよりもガラクトースの方が高い収率を示した。また、グリセロールと糖の反応性と同様の傾向であったことから、糖と多価アルコールとの反応性には、糖分子が強く関係していると考えられる。

ガラクトースと糖アルコールとの反応性を Table 8 に示した。エリスリトール（融点; 121℃）については、Table 8 に示した条件で溶解せず本研究においては合成を確認していない。HPLC 分析により、キシリトールおよびソルビトールで合成物と思われる保持時間にピークを検出した。

2.3.2 Gal-G の合成条件の検討

糖に対して 10～20 倍モル以上のアルコールを添加すれば縮合物を十分抑制できることが報告されている [51]。本研究においては、縮合物の生成を十分に抑制する目的でガラクトースに対してグリセロールを 50 倍モルで使用した。反応温度についても主生成物と副産物の水との褐変反応を抑制するために 150℃以下であること、そして、反応速度の観点から 80℃以上あることが望ましいことが報告されている [51]。Gal-G の合成における触媒量の影響を Fig.21 に示した。反応を 108℃で行い、グリセロール 100ml に対して添加するリン酸量を変えた。リン酸量の増加と共に Gal-G の生成速度が上昇することが分かった。また、触媒として硫酸を用いた時にも HPLC 分析より保持時間 11.5min にピークを検出した。しかし、硫酸では反応が急速に進行するためグリセロール 100ml に対して添加する場合、予めグリセロールで 100 倍に希釈した後添加する必要があった。Gal-G の合成に対する温度の影響を Fig.22 に示した。リン酸量 20μl で合成を行ったところ、反応温度の上昇と共に Gal-G の生成速度が上昇することが分かった。しかし、反応温度 137℃においては、反応終了後の反応液で着色が見られた。工業的には、この褐変反応を抑制するために副産物の水の除去として、窒素の吹き込みや減圧下で反応を行うなどの手法が行われている [50-51]。本研究においては、褐変が見られず 2h で反応を終了した条件（ガラクトース 5g、グリセロール 100ml、反応温度; 108℃、リン酸量; 20μl）を以後の実験に用いた。

2.3.3 Gal-G の精製法の検討

従来から多価アルコールが活性炭に対して吸着性を示さないことが知られている [30]。本研究に用いた活性炭においても、グリセロール及びエチレングリコールが吸着しないことを HPLC 分析から確認した。活性炭 100g に対して蒸留水 3L で洗浄を行った場合、活性炭へのグリセロールの吸着が見られず、反応液に残存する Gal-G とグリセロールを分離できることが分か

った（Fig.23）。HPLC 分析から算出した活性炭 100g に対する合成 Gal-G の吸着量は、約 3.6g であった。また、HPLC クロマトグラムから推算される合成物の純度は、約 90%であった。触媒として添加したリン酸については、精製した合成物の水溶液が中性であることと、合成物を吸着した活性炭を洗浄した際、ろ液が酸性を示したことから洗浄液と共に除去されていると思われる。既報によれば、触媒として除去の容易な固体酸やイオン交換樹脂を用いることなどが報告されている＊。本研究の手法においても上記のような措置が今後の重要な課題である。本研究においては、全て活性炭で精製された合成物を用いた。

Gal-G の反応溶液（2.2.5 参照）を種々の溶媒に添加し、Gal-G とグリセロールの溶解性について HPLC 分析を用いて調べた。反応液をエタノールおよびメタノールに添加した場合、沈殿物は全く生じなかった。ヘキサンおよびジエチルエーテルに添加した場合、合成 Gal-G、グリセロール共に全て沈殿した。Gal-G の回収率およびグリセロールの除去率を HPLC 分析により算出した。反応の際にガラクトースを逐次添加することにより、縮合物の生成を抑制できると共に反応液中に Gal-G を濃縮できることを HPLC 分析にて確認した。n-ブタノールにおいて、グリセロールを 90%除去できているのに対して、Gal-G の回収率は低かった。アセトニトリルおよびアセトンでは、約 90%以上の高い回収率で Gal-G を得ることができ、グリセロールをある程度溶解させ除去できることが分かった。2% (w/v) の反応溶液をアセトンに添加し、一昼夜冷凍保存することにより、一度の抽出操作で Gal-G の純度が約 50%まで向上することが分かった。また、ヘキサンとアセトンの混合溶液 2:8 (v/v) で実験を行った場合でも同様に約 50%まで Gal-G の純度が向上した。このことから、反応液に対して Gal-G を濃縮させることで、水分添加を行わず溶媒抽出である程度まで純度を高められる可能性を見出した。

2.3.4　質量分析

Fig.24 は、合成 Gal-G の MS クロマトグラムおよび MS スペクトルである。Fig.24-a は、合成 Gal-G の HPLC クロマトグラムであり、保持時間 5.7～7min に最も強いシグナルを示した。保持時間 5.7-7min までの MS スペクトルが Fig.24-b である。プロトンが 1 つ取れた状態で検出されたと推測した場合、ガラクトースとグリセロールがモル比 1:1 で結合した分子量 253.16 $[M-H]^-$に最も強いシグナルを示した。このシグナルがフラグメントとして検出された可

能性を考慮し、高分子量側についても m/z 900 まで示しているが、特徴的なシグナルは確認できない。このことから、合成 Gal-G に含まれる主成分の分子量は、254 であると推定した。また、1 章において紅藻類マクサから同定した Gal-G に一致する分子量であることが分かった。Fig.24-c の MS スペクトルは、保持時間 7.9-8.8min までの結果である。分析の結果、グリセロールに対してガラクトースが 2 分子結合した分子量に一致する m/z 415 $[M-H]^-$に最も強いシグナルを示した。

Fig.25 は、ガラクトースとグリセロールをモル比 1:1 として合成された試料の MS スペクトルである。Fig.24-a と同様に、5.7-7min および 7.9-8.8min にピークが確認された (Fig.25-a)。データを示していないが、保持時間 9.2-10.6min に検出されたピークにおいて、m/z 415 に最も強いシグナルを示した。また、保持時間 13.5-14.4min を分析した結果 (Fig.25-b)、グリセロールに対してガラクトースが 3 分子結合した分子量に一致する m/z 577 に強いシグナルを示した (Fig-25-c)。

Fig.26 は、ガラクトースとエチレングリコールをモル比 1:1 で反応させて合成した Gal-E の MS クロマトグラムである。保持時間 5-10min の範囲で合成物と思われるピークを確認した (Fig.26-a～c)。保持時間 4.5-15min の範囲の MS スペクトルは、m/z 223 および m/z 385 に強いシグナルを示した (Fig.26-d)。このことから、エチレングリコールに対して、ガラクトースが 1 分子および 2 分子結合した分子量に一致するシグナルであることが分かった。

2.3.5 酸加水分解

合成 Gal-G の酸加水分解における糖濃度の経時変化を Fig.27 に示した。反応時間の経過と共に Gal-G の濃度が減少し、ガラクトース量および還元糖量が増加することが分かった。また、完全加水分解後に酵素法を用いてガラクトースとグリセロールを定量したところ、モル比 1:1 でガラクトースとグリセロールが結合していることが分かった。加水分解前の Gal-G は、還元性を示さなかった。このことから、ガラクトースの反応性の高いアノマー位に対してグリセロールが結合していると推測した。

2.3.6　合成物の分離・精製

Fig.28-a は、合成 Gal-G と紅藻類マクサから同定された Gal-G の TLC クロマトグラムである。分析の結果、マクサからの Gal-G が単一のスポットであるのに対して、合成物においては 3 スポットに分離した（Fig.28-a)。そこで、今後の NMR 分析により構造を定めるためにシリカゲルクロマトを用いて合成 Gal-G の分離を試みた。溶離液には、n-ブタノール:エタノール:水の混合液組成を様々に変え、TLC 分析により検討を行ったところ、混合比 3:3:0.5 および 3:2:0.5 が良好な分離を示した。また、ループの長さ（200μl-1ml)、流速（0.6-1.4ml/min）を様々に変え、シリカゲルクロマトによる分離を行った結果、実験方法 2.2.7.2 に記載した条件で最も良い分離能を示した。Gal-G が溶離液に溶解しない問題の措置として 40%(v/v)蒸留水を溶離液に添加した。溶離液(移動相)の水分の割合を増加させた場合、TLC 分析において Gal-G の 3 スポットの分離能は低下した。Gal-G を溶解し試料が移動相の溶離液に難溶の場合、移動相よりも溶出力の小さい溶媒の添加ならば、分離能に対する影響を抑制できるとされている [53]。

シリカゲルクロマトによる分画後の TLC クロマトグラムを Fig.28-b に示した。参照試料として合成した Gal-G を用いた。分画した画分を大きく A、B、C の 3 つの画分に分離し、回収した。画分 A および C においては、参照試料の 3 スポットから見て、単一スポットに精製されたことが確認された。しかし、画分 A および C について NMR 分析を行なったところ、まだ混合物であることを確認したため、現在、更なる分離を検討している。画分 B については、シリカゲルクロマトによる分離・精製を繰り返し濃縮後、再度分離を試みる予定である。

2.3.7　機能性の評価および紅藻類マクサ由来フロリドシドとの比較

合成物とフロリドシドのメイラード反応性を Fig.29 に示した。メイラード反応は、還元糖とアミノ酸のアミノカルボニル反応によって着色物質（メラノイジン）を生じる反応である。グルコースやガラクトースなどの還元糖では、グリシンとの縮合反応により着色が見られた。グルコースの 2 位にアミノ基が結合したグルコサミンにおいても、同様に着色が見られることが分かった。標準物質のスクロースおよびフェリシアナイド法により還元性を示さなかった試料(Gal-G、Glc-G、フロリドシド）については、メイラード反応性を示さないことが確認された。また、アノマー位に対してメチル基が結合したメチルグルコシドにおいても、メイラード反応性

を示さなかった。このことから、糖の反応性のあるアノマー位に非還元物質が結合することでメイラード反応性を失うと推測された。

加熱（160℃）による Gal-G の着色性を Fig.30 に示した。糖分子が加熱により脱水・縮合を繰り返し着色することをカラメル化反応という。異なる pH で着色を評価したところ、pH7 において、グルコース、ガラクトースにおいて強い着色が見られたのに対して、Gal-G では着色しなかった。スクロースが pH4 において他の試料に比べ強く着色していることは、既存の報告と一致している [9]。

加熱（160℃）による Gal-G の安定性を Fig.31 に示した。グルコースおよびガラクトースでは、pH7 において残存率が低下し、pH4 において安定であることが分かった。スクロースで pH4 の時に残存率が大きく低下し、Gal-G で 30%程度低下することが確認された。pH7 と pH4 の両方おいて着色せず、高い残存率を示した Gal-G は、熱に対して安定であることが分かった。

う触性試験の結果を Fig.32 に示した。口内細菌（ラクトバチルス菌など）により有機物が代謝され、生産される有機酸の影響をう蝕として評価した。グルコースおよびガラクトースにおいて、2 時間経過後から pH の低下が見られた。合成物では、コントロールの蒸留水と比較して、ほとんど pH の低下は見られなかった。コントロールよりも低い pH を示すことは、合成物の精製の際に残存する原料の糖（ガラクトースおよびグルコース）の影響と考えられる。また、データを示していないが、18 時間経過後でも同様の結果であることを確認した。このことから、合成物が口内細菌により代謝されにくい物質であることが分かった。

生体内における消化性試験の結果を Table 9 に示した。消化率を HPLC 分析から算出した。酵素の活性の有無は、マルトースを用いて所定条件（37℃、24h）で確認した。分析の結果、Gal-G は、全ての酵素によって全く分解されなかった。しかし、Glc-G では、小腸内の酵素によりある程度の分解されることが分かった。

メイラード反応性、加熱着色・安定性、う触性、消化性で同様の傾向が、既往の研究において酵素で合成されたグルコシルグリセロール [9]、消化性に関しては天然のスサビノリからのガラクトシルグリセロール [4]において報告されている。

フロリドシドに対して分解活性を示した酵素（Table 4 参照）について Gal-G でも同様の試験を行った結果を Table 10 に示した。ニューラーゼ F3G 以外の酵素において Table 4 の

フロリドシドと同様の傾向が見られた。メイセラーゼ（20g/l）で Gal-G（3g/l）が、48 時間の反応で完全に分解されることを確認した。セルラーゼは、セルロースのβ1,4 結合を加水分解する酵素である。セルラーゼによりフロリドシドおよび合成 Gal-G が分解されたことを、夾雑酵素による影響を含めて検討する必要がある。1 章で述べたように、グルコシルグリセロールにおいてグルコースとグリセロールのα結合が α-グルコシダーゼで分解できることが報告されている。そこで、β型の Gal-G の分解を試みるため、β-ガラクトシダーゼ(粗酵素)による分解実験を行った。しかし、Gal-G は分解されないことが分かった。今後、精製されたβ-ガラクトシダーゼについても同様に検討する必要がある。

合成 Gal-G とフロリドシドのα-アミラーゼの活性化を Fig.33-a に示した。Gal-G を構成するガラクトースおよびグリセロールについては、α-アミラーゼの活性化効果が見られなかった。それに対して、フロリドシドおよび合成 Gal-G で豚のα-アミラーゼを濃度依存的に活性化することが分かった。また、合成 Gal-G よりもマクサ由来のフロリドシドの方が、より低濃度で豚のα-アミラーゼを活性化することが分かった。合成物においても同様の傾向が見られたことから、本研究の手法によりフロリドシドに類似した構造の物質が合成されたと考えられる。現在までにフロリドシドにおいて豚のα-アミラーゼを活性化した報告がないことから、フロリドシドの新規の生理活性であると考えられる。

種々の糖で合成したグリコシルグリセロールによるα-アミラーゼの活性化を Fig.33-b に示した。本試験でのα-アミラーゼの濃度では、フロリドシドおよび Gal-G が分解されないことを確認した。合成物の原料である単糖やグリセロールでは、α-アミラーゼの活性化効果は見られなかった。全ての合成物 4g/l でα-アミラーゼ活性をおよそ 2 倍活性化することが分かった。従って、α-アミラーゼを活性化する要因として合成物の糖の種類は関与しないことを示唆した。還元糖量を経時的に測定した結果を Fig.33-b の図中に示した。コントロールの蒸留水と比較して還元糖の生産速度が上昇した。このことからも、何らかの形でグリコシルグリセロールの添加により酵素活性が高まり、デンプンの分解が促進されることが確認できた。

Table 6　糖類とグリセロールの反応性

糖類	反応条件	還元性	収率(%)	略号
ガラクトース		＋	74	Gal-G
マンノース	リン酸;20μl	＋	34	Glc-G
ラムノース	108±2℃, 1h	＋	18	Man-G
グルコース		＋	12	Rha-G
フルクトース		＋	－	－
キシロース		＋	－	－
スクロース	リン酸;50μl	－	－	－
マルトース	80℃, 5day	＋	－	－
ラクトース		＋	－	－
セロビオース		＋	－	－

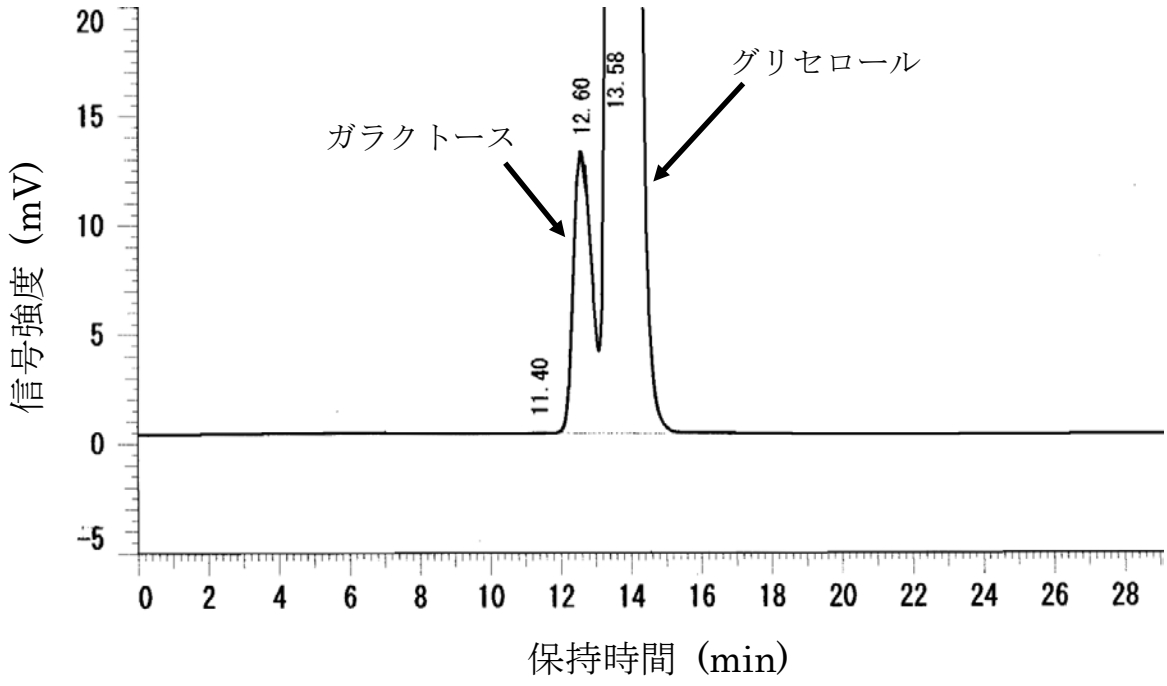


Fig.20-a　Gal-G 合成の HPLC クロマトグラム(反応前)

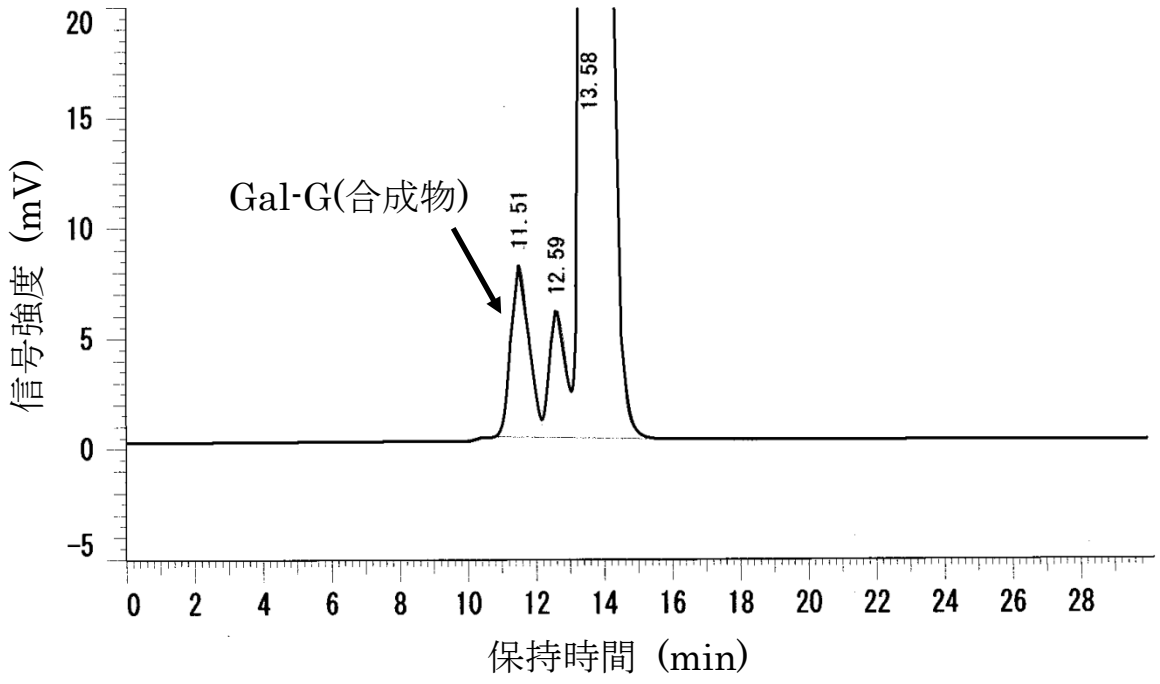


Fig.20-b　Gal-G 合成の HPLC クロマトグラム(反応 30min)

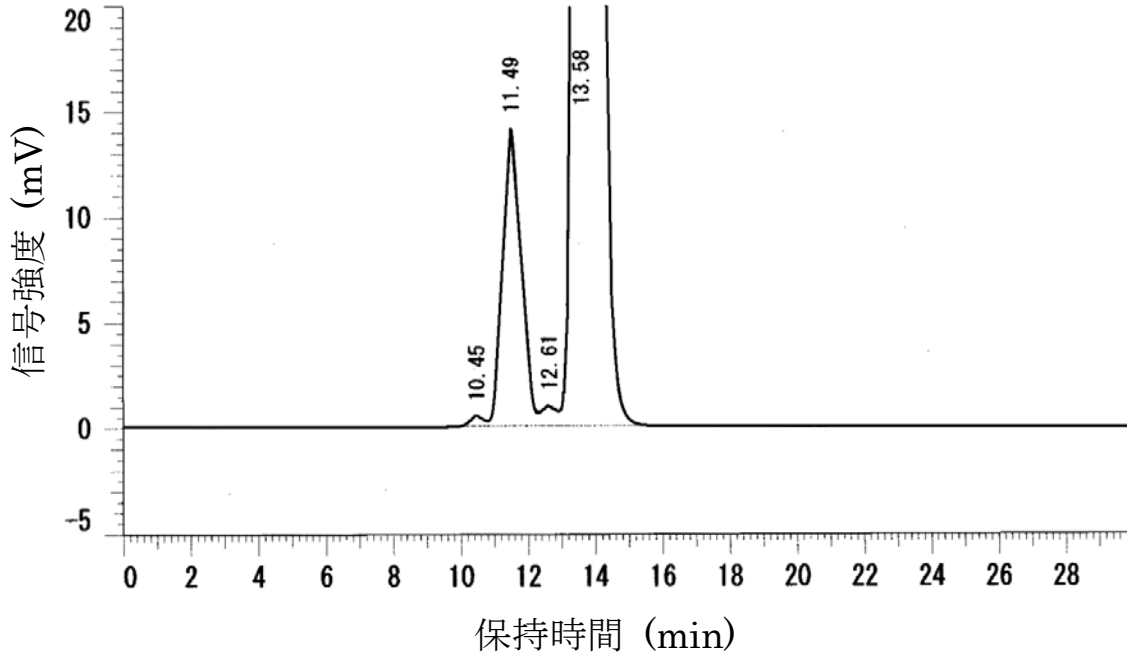


Fig.20-c　Gal-G 合成の HPLC クロマトグラム(反応 180min)

Table 7　糖とエチレングリコールの反応性

糖	反応条件	収率(%)	略号
ガラクトース	リン酸；20μl	62	Gal-E
グルコース	108±2℃, 1h	3	Glc-E

Table 8　ガラクトースと糖アルコールの反応性

糖アルコール	反応条件	反応性
ソルビトール	リン酸；50μl 120℃, 4h	＋
キシロース		＋
エリスリトール		－

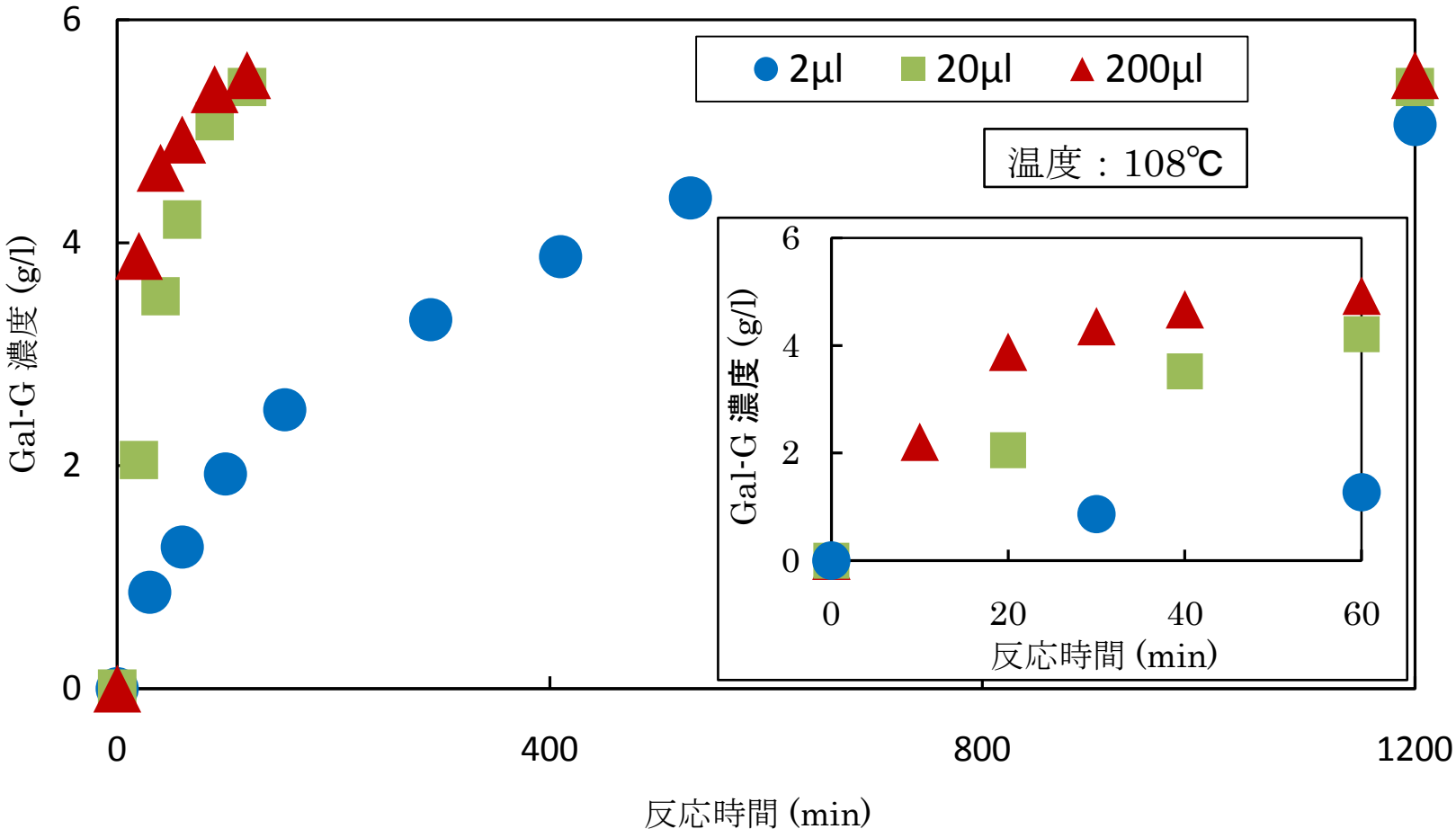


Fig.21　Gal-G の合成における触媒量の影響

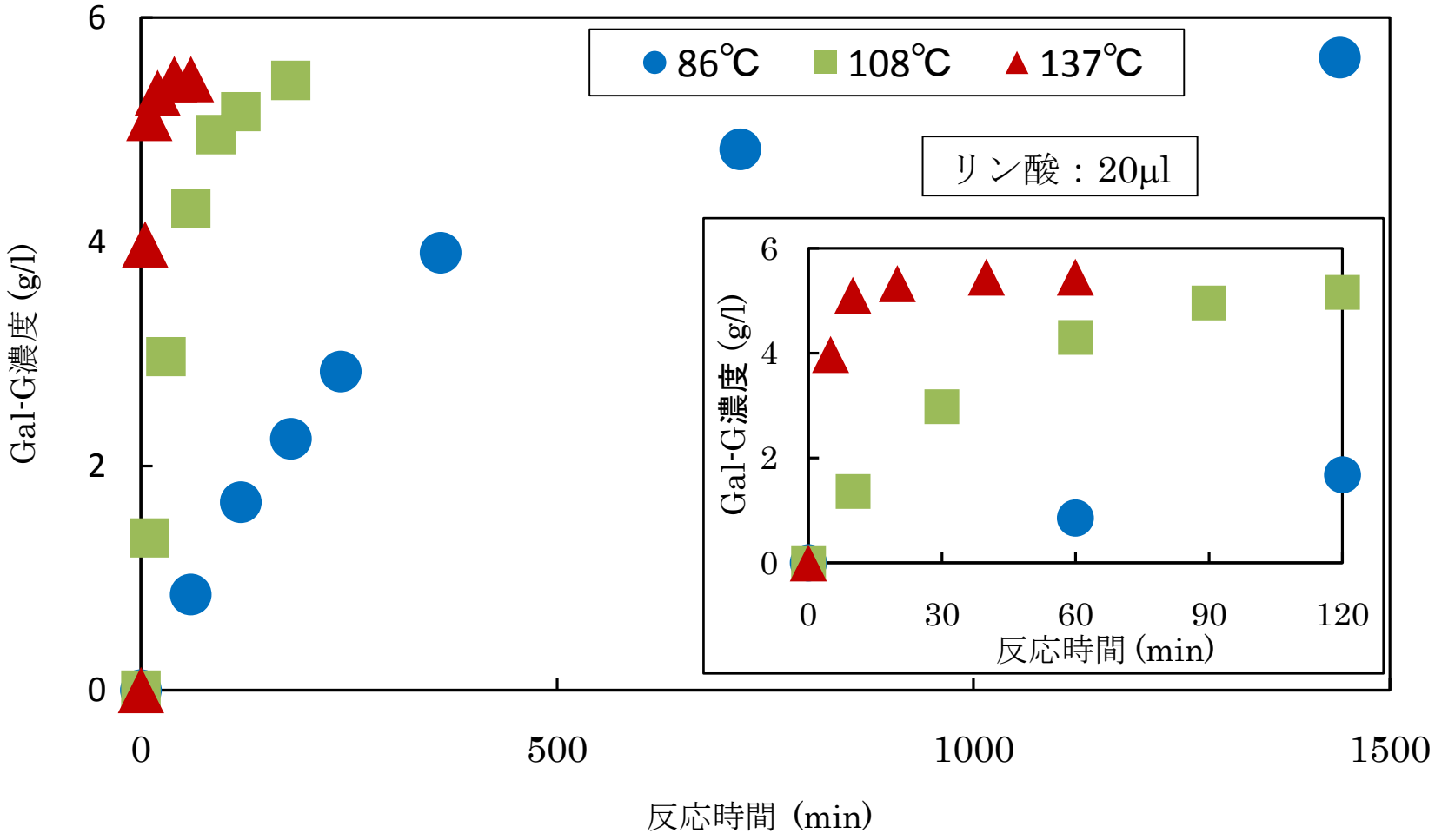


Fig.22　Gal-G の合成における温度の影響

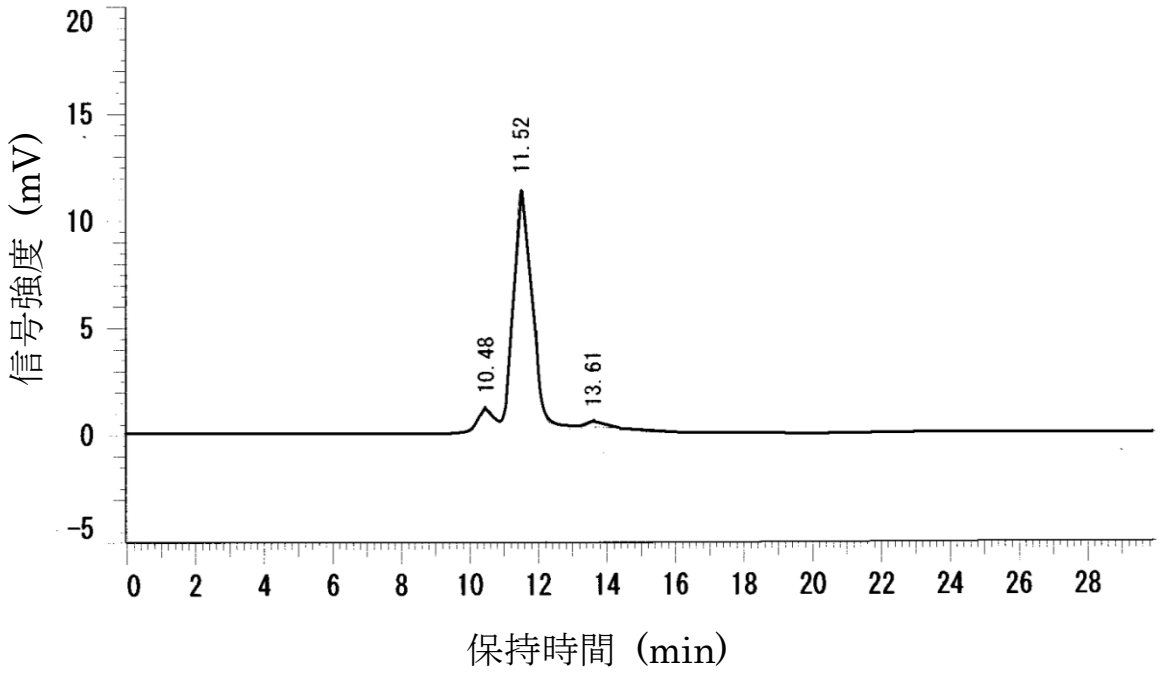


Fig.23　活性炭精製後の Gal-G の HPLC クロマトグラム

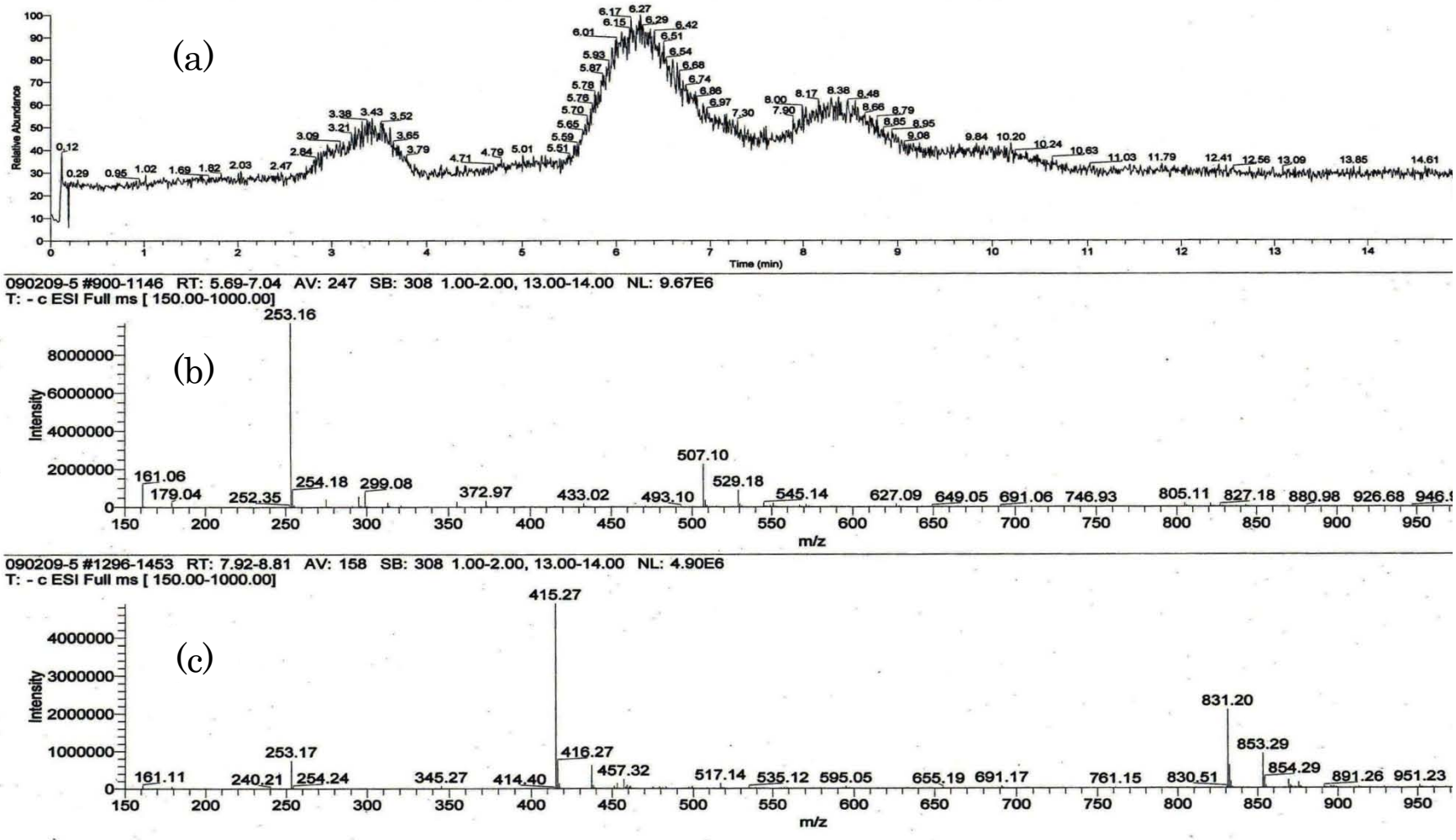


Fig.24　Gal-G の MS クロマトグラムおよびスペクトル

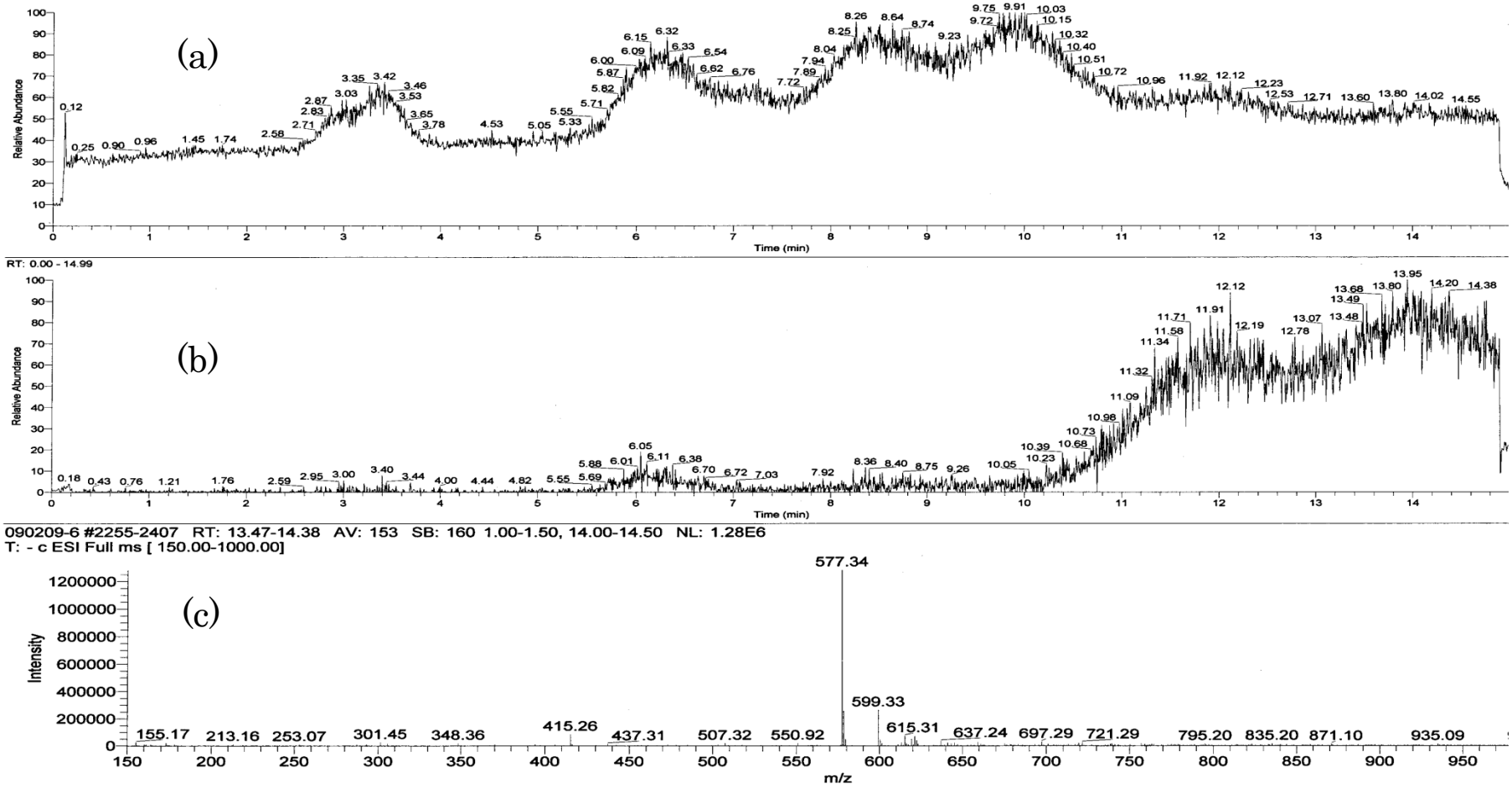


Fig.25　Gal-G の MS スペクトルおよびスペクトル

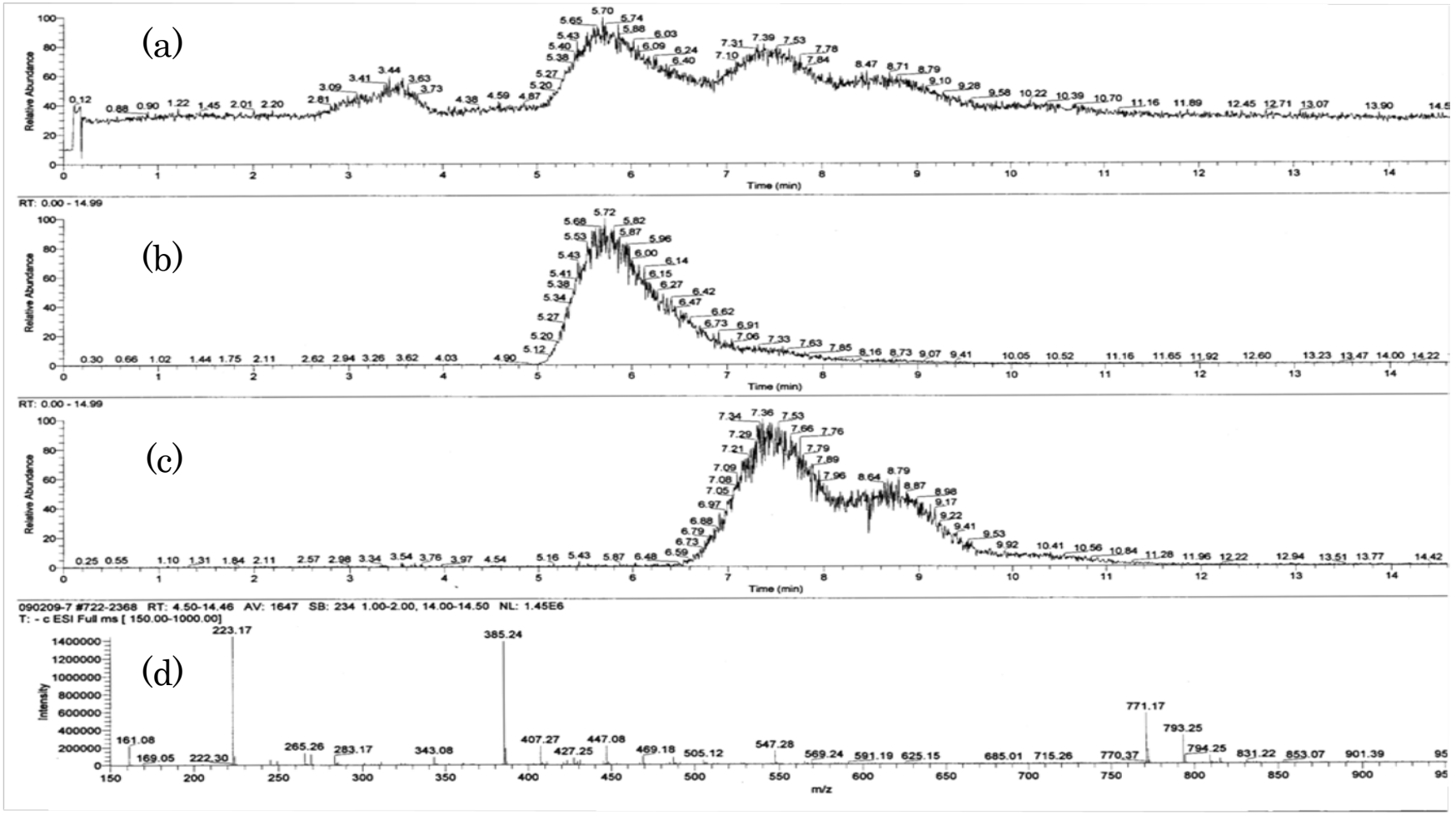


Fig.26　Gal-E の MS クロマトグラムおよびスペクトル

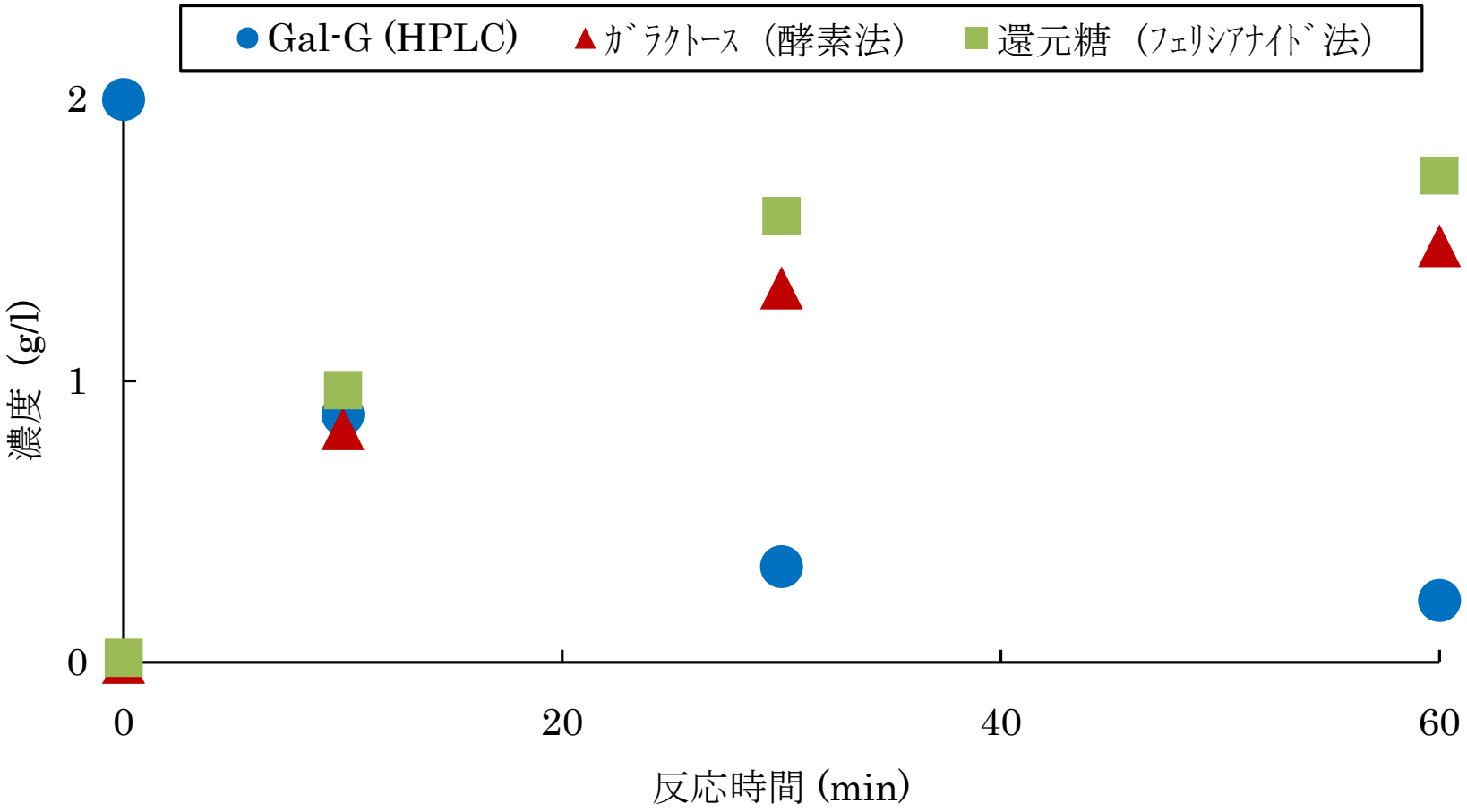


Fig.27　合成した Gal-G の加水分解における濃度の経時変化

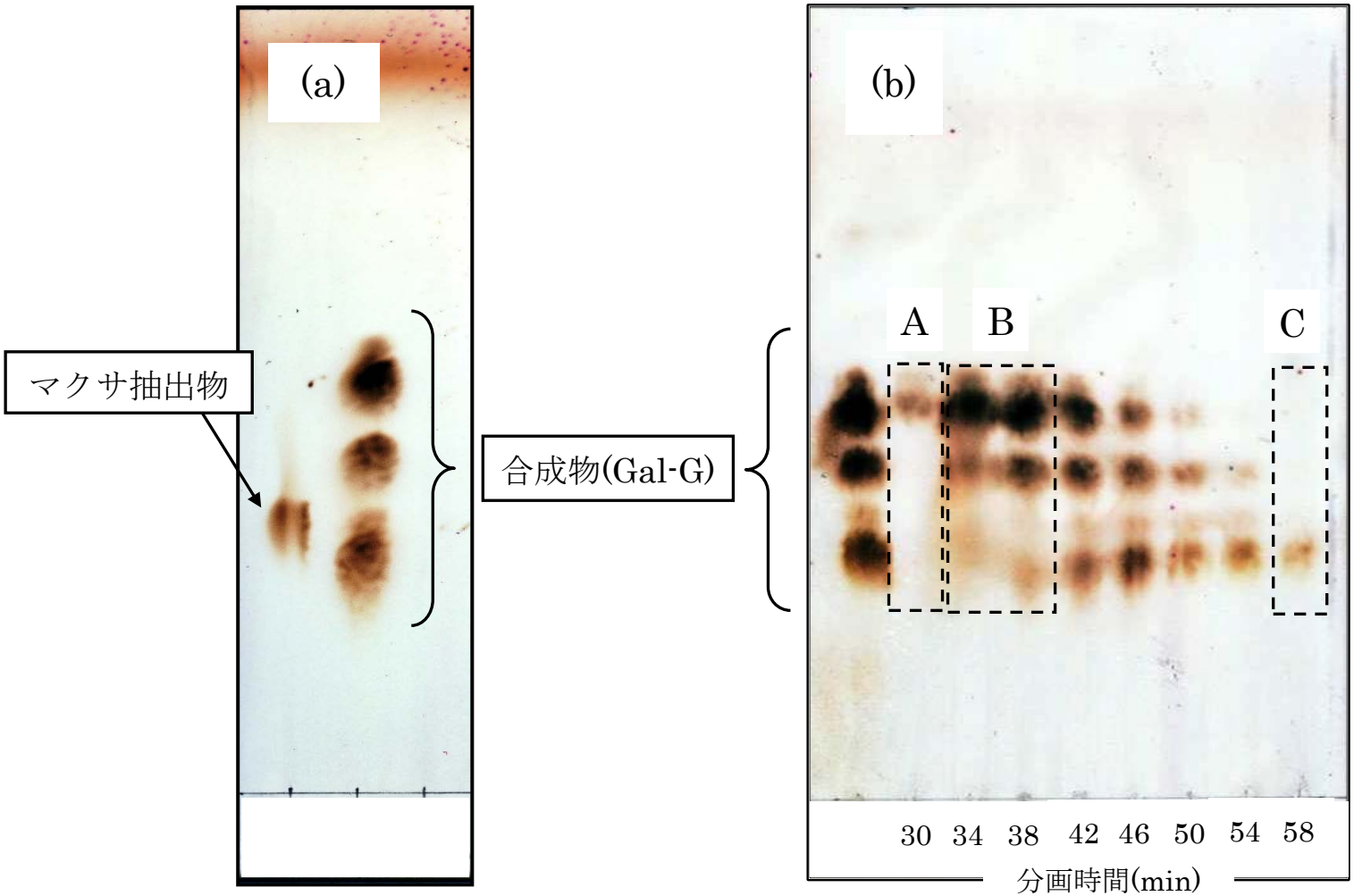


Fig.28　分離した合成物（Gal-G）の TLC クロマトグラム

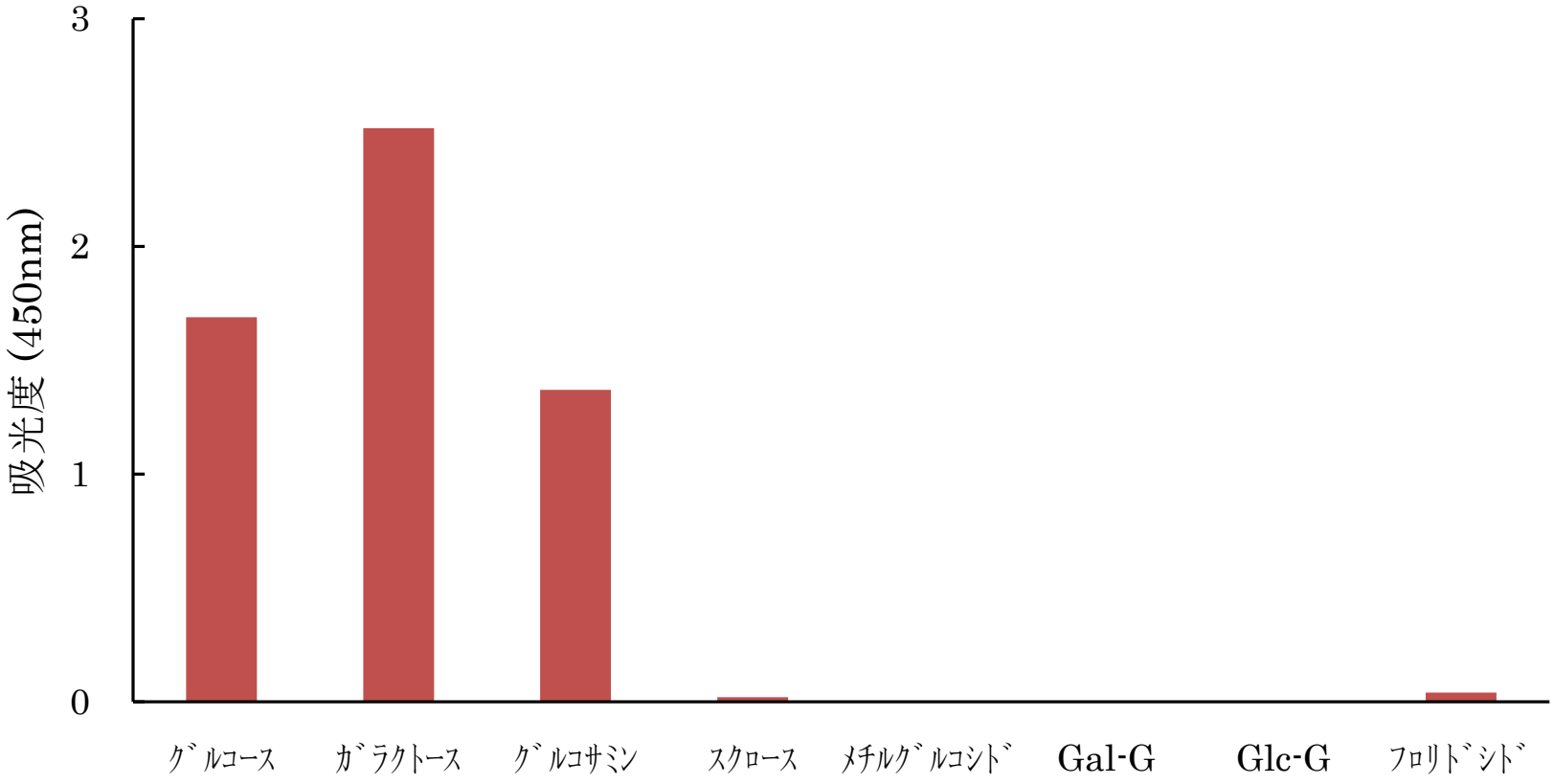


Fig.29　メイラード反応性

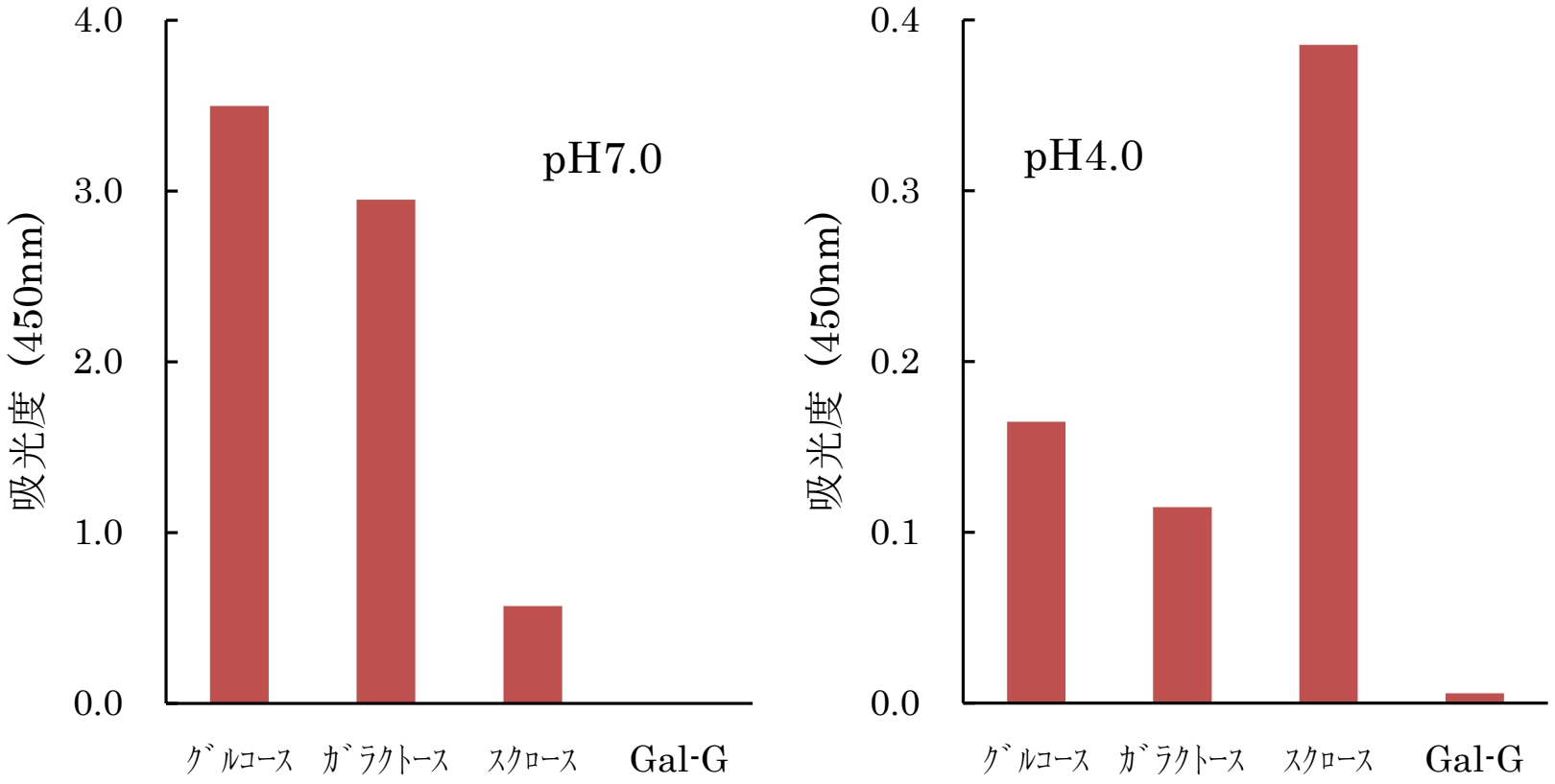


Fig.30　Gal-G の加熱着色性（160℃）

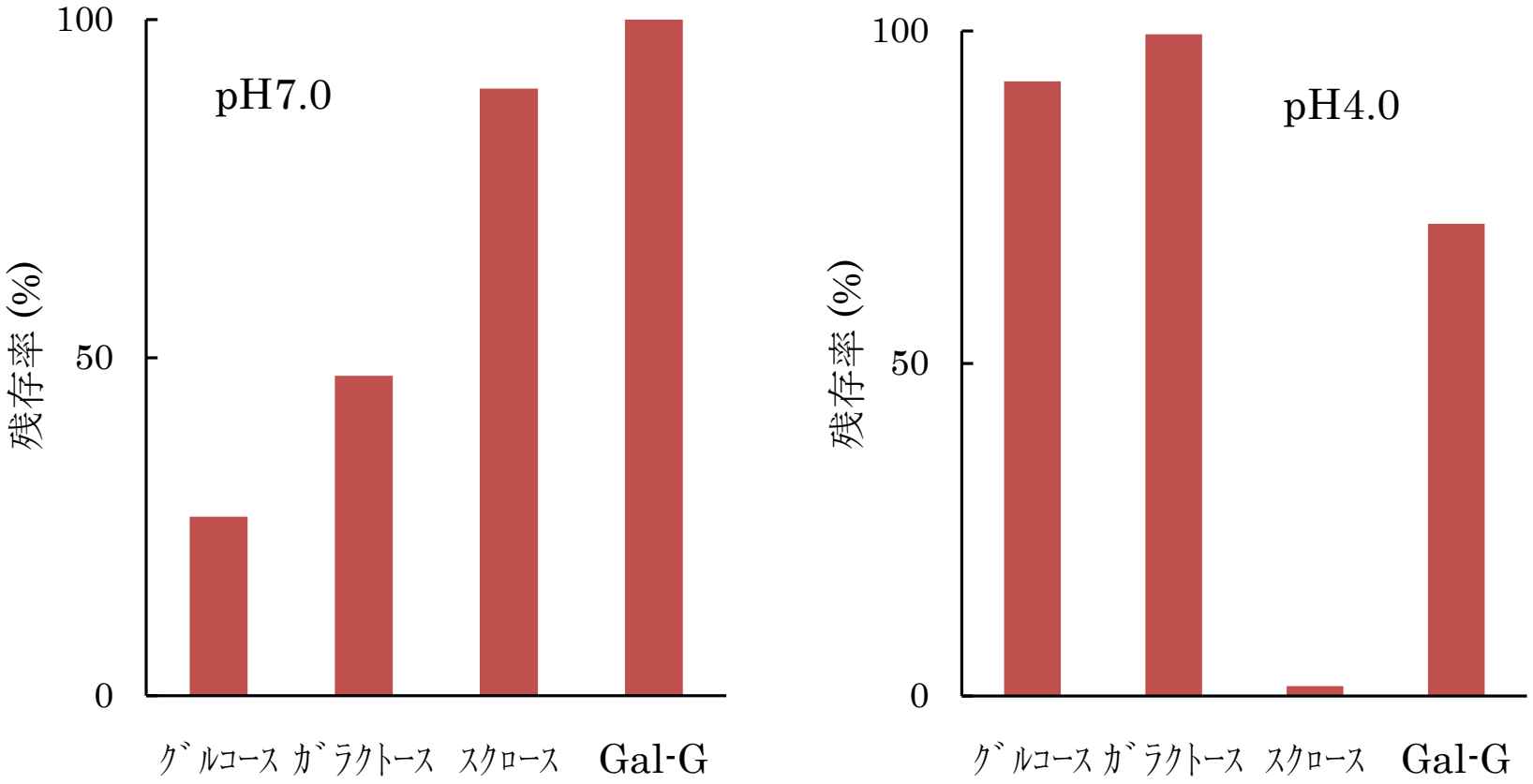


Fig.31　Gal-G の加熱安定性（160℃）

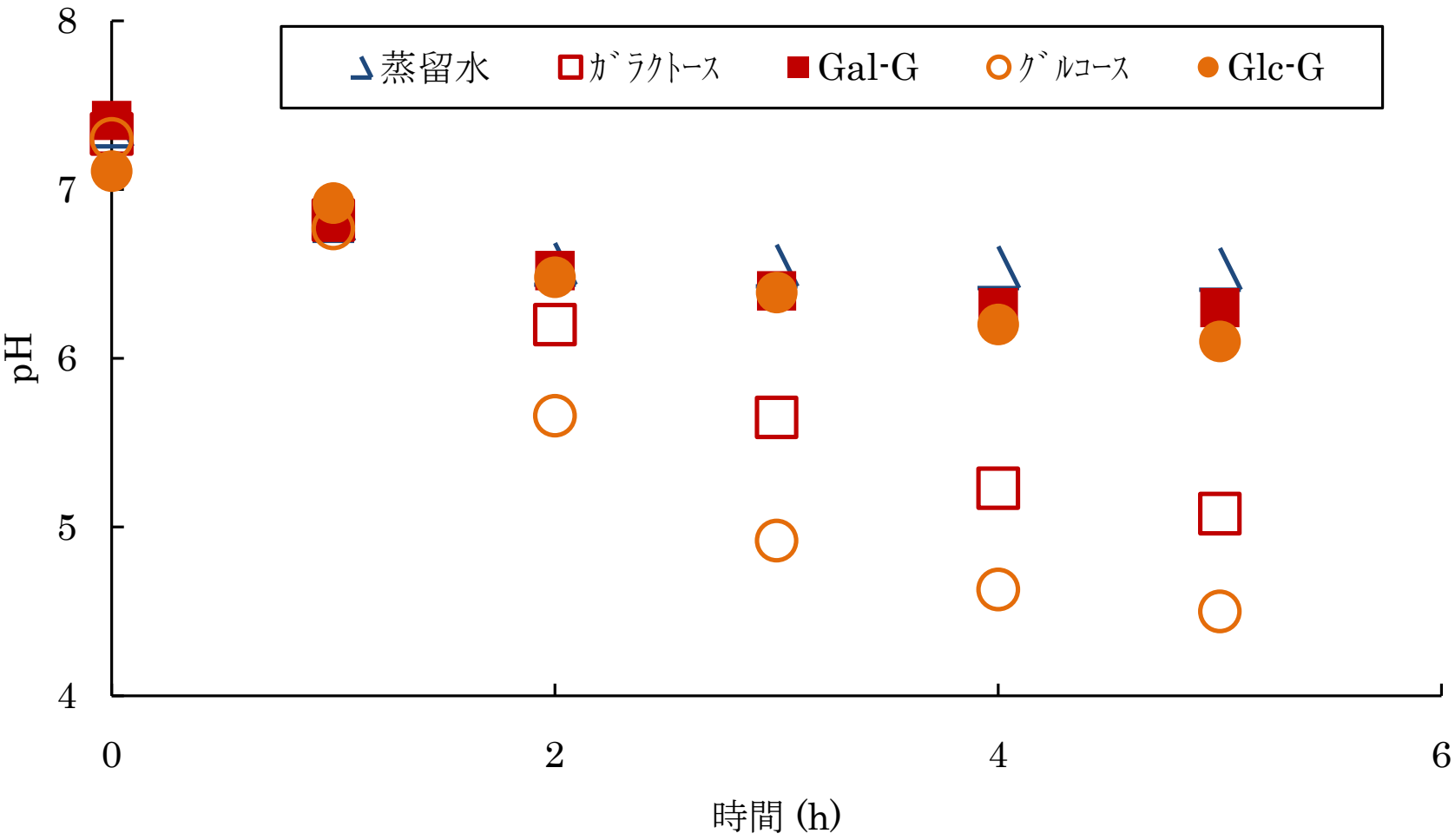


Fig.32　Gal-G と Glc-G のう蝕性

Table9　Gal-G と Glc-G の消化性

	反応条件	消化率(%)	
		Gal-G	Glc-G
ヒトの唾液	37℃, 24h	0	0
人工的な胃液		0	0
豚の膵臓由来α-アミラーゼ		0	0
ラット小腸アセトン粉末		0	58

Table10　Gal-G の消化性

酵素	分解活性
メイセラーゼ（明治製菓社製）	−
セルラーゼ（Wako 社製）	−
リパーゼ A	−
ニューラーゼ F3G	＋
大腸菌由来β-ガラクトシダーゼ（粗酵素）	＋

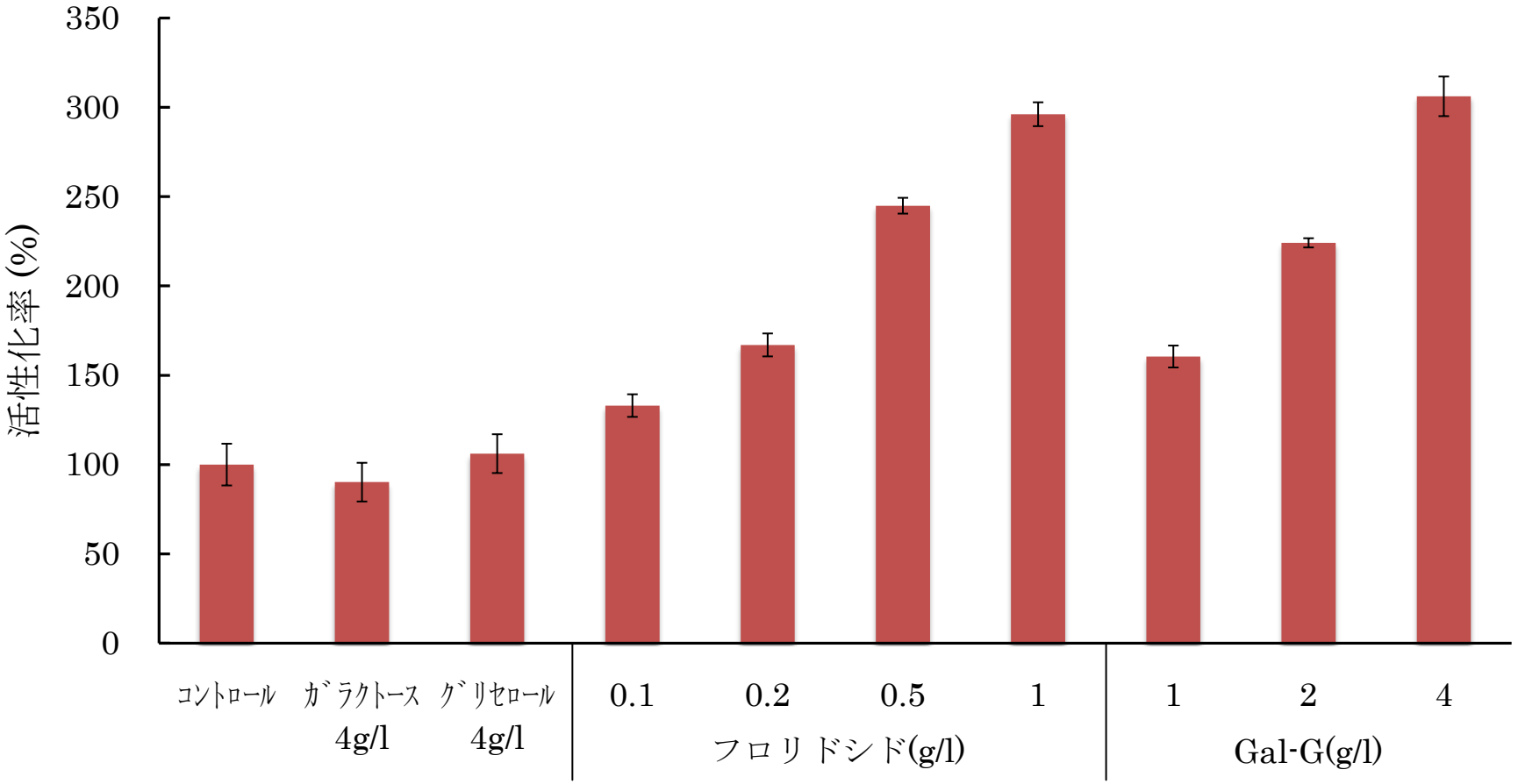


Fig.33-a　α-アミラーゼの活性化

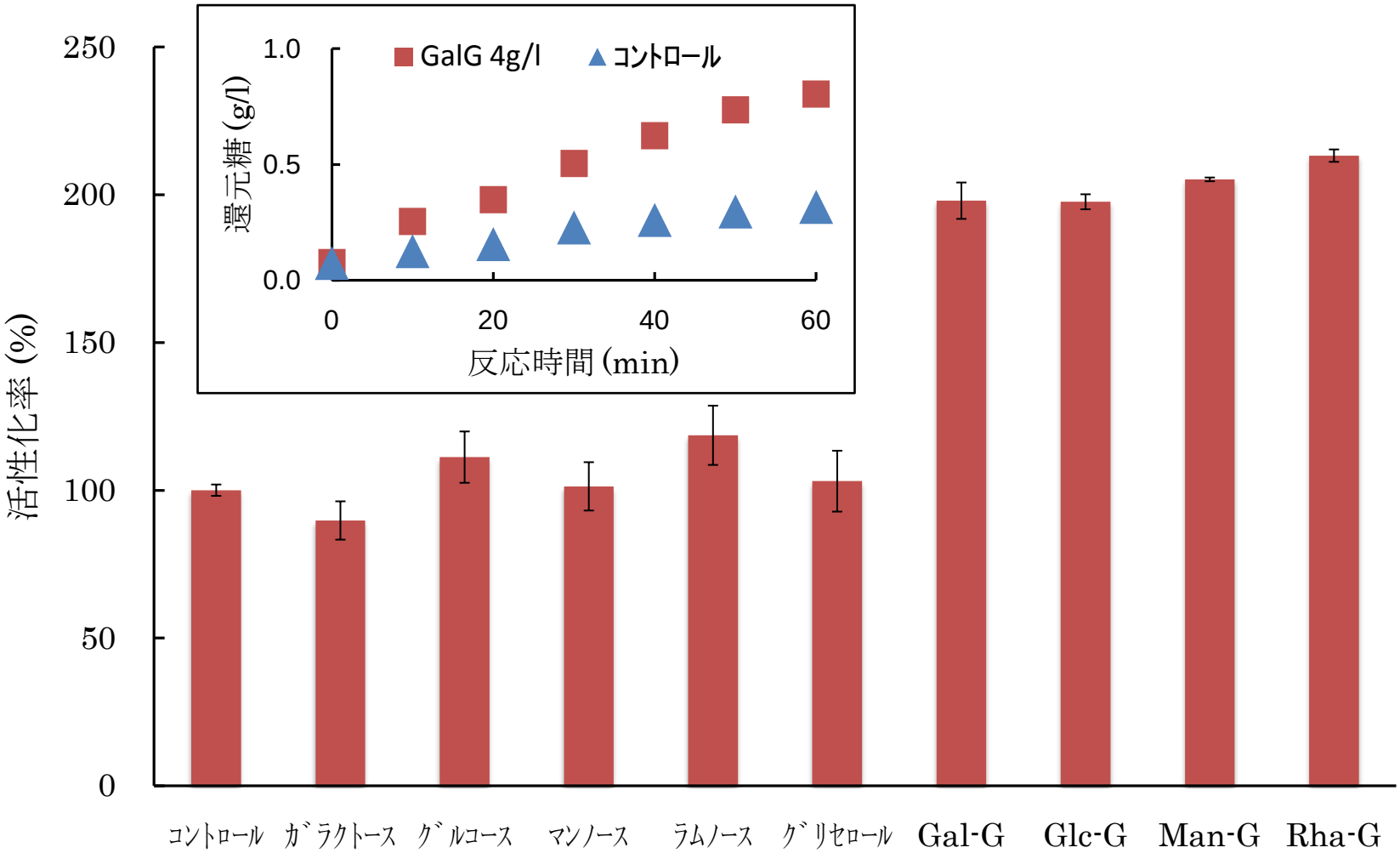


Fig.33-b　α-アミラーゼの活性化（濃度; 4g/l）

結　言

LC-MS および ^{1}H・^{13}C-NMR の結果から、紅藻類テングサからの水抽出物の主成分が、フロリドシド (2-O-α-Gal-G) であると同定した。ガラクトースとグリセロールとの縮合物 (Gal-G) は、テングサから得られたフロリドシドと同じ分子量であり、モル比 1:1 でガラクトースとグリセロールが結合していることが分かった。また、カルボニル基を有する化合物とアミノ酸との反応であるメイラード反応性を示さなかったことから、ガラクトースのアノマー位の炭素にグリセロールが結合していると推測した。フロリドシドおよび種々の糖とグリセロールとの合成物を添加することによって、豚のα-アミラーゼを活性化することが分り、その活性化の程度は、糖の種類に関わらず同程度であった。

謝　辞

本研究を行うにあたり、厳しくも優しい指導と日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた有賀修 准教授に厚く御礼申し上げます。本論文の副査として指導を頂きました松元信也教授、大濱武 教授に心より感謝申し上げます。NMR の分析から解析までを行って頂いた南貴美氏、質量分析を行って頂いた高知県工業技術センター 森山洋憲氏、ピロリ菌を用いた実験を行って頂いた高知大学医学部 竹内晃氏、本研究に対しての有益な議論と助言を頂きました JST イノベーションサテライト高知 細川隆弘氏に心より感謝申し上げます。

実験の実施に際して協力と議論にお付き合い頂いた浦尻学典君、江村直君、武内章君、日々の実験において互いに助言しあい有益な議論を頂いた大石健人君、久保元君に心から感謝致します。加えて、NMR 分析結果の解析に際して有益な助言を頂いた小廣研究室 須本果奈さん並びに院生諸君に心から感謝致します。最後に、実験を行うにあたり協力して頂いた有賀研究室の皆様に感謝致します。

参考文献

1) Karsten U., Kevin DB., King Robert J.: Floridoside, L-floridoside, and D-isofloridoside in the red alge *porphyra columbina* : Seasonal and osmotic effects, *Plant physiol.*, 103, 485-491(1993).

2) Karsten U., West JA.: Living in the intertidal zone: seasonal effects on heterosides and sun-screen compounds in the red algae *Bangia atropurpurea, J.Exp.Mar.Biol.Ecol.,* 254, 221-234(2000).

3) Courtois A., Simon-Colin C., Boisset C., Berthou C., Deslandes E., Guezennec J. and Bordron A.: Floridoside extracted from the red alge *mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway, *Mar. Drugs*, 6, 407-417(2008).

4) Muraoka T., Ishihara K., Oyamada C., Kunitake H., Hirayama I., and Kimura T.: Fermentation properties of low-quality red alge susabinori *porphyra yezoensis* by intestinal bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 72, 1731-1739(2008).

5) Williamson JE., Nys RD., Kumar N., Carson DG. and Steinberg PD.: Induction of metamorphosis in the sea urchin *holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from the algal host *delisea pulchra*, *Biol. Bull.*, 198, 332-345(2000).

6) Ishii T., Okino T., Suzuki M. and Machiguchi Y.: Tichocarpols A and B, two novel phenylpropanoids with feeding-deterrent activity from the red alge *tichocarpus crinitus*, *J. Nat. Prod.*, 67, 1764-1766(2004).

7) 独立行政法人水産総合研究センター: グリセロールガラクトシドの抽出方法, 特願 2006-117517.

8) Takenaka F., Uchiyama H. and Imamura T.: Identification of α-D-glucosylglycerol in sake, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 378-385(2000).

9) Takenaka F. and Uchiyama H.: Synthesis of α-D-Glucosylglycerol by α-Glucosidase and some of its characteristics, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 64, 1821-1826(2000).

10) Shinoyama H., Suzuki M., Yamasawa A. and Fujii T.: The possibility of enzymatic synthesis of glyceroglycolipids, *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.,* 50, 41-47(1996).

11) Colombo D., Ronchetti F., Scala A., Taino IM. and Toma L.: A facile lipase catalyzed access to fatty acid monoesters of 2-O-β-D-Glucosylglycerol, Tetrahedron: *Asymmetry,* 7, 771-777(1996).

12) Murakami A., Nakamura Y., Koshimizu K. and Ohigashi H.: Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate in mouse skin, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2779-2783(1995).

13) Shirahashi H., Morimoto T., Nagatsu A., Murakami N., Tatta K., Sakakibara J., Tokuda H. and Nishino H.: Antitumor-promoting activities of various synthetic 1-O-acyl-3-O-(6'-O-acyl-β-D-galactopyranosyl)-sn-glycerols related to natural product from freshwater Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae f. flos-aquae, Chem. Pharm. Bull.,* 44, 1404-1406(1996).

14) Colombo D., Scala A., Taino IM., Toma L., Ronchetti F., Tokuda H., Nishino H., Nagatsu A. and Sakakibara J.: Inhibitory effects of fatty acid monoesters of 2-O-β-D-glucosylglycerol on Epstein-Barr virus activation, *Cancer Letters*, 123, 83-86(1998).

15) Well MJ., Zhang Y. and Nair MG.: Tumor cell proliferation and cyclooxygenase inhibitory constituents in Horseradish (*Armoracia rusticana*) and wasabi (*Wasabia japonica*), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1440-1444(2005).

16) Larsen E., Kharazmi A., Christensen LP. and Christensen SB.: An anti-inflammatory galactolipid from Rose Hip(Rosa canina) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro, *J. Nat. Prod.*, 66, 994-995(2003).

17) Cateni F., Falsone G., Zilic J., Bonivento P., Zacchigna M., Zigon D., Sosa S. and Altinier G.: Glyceroglycolipids from *Euphorbia nicaeensis* all. with antiinflamatory activity, *Arkivoc*, 54-65(2004).

18) Hou CC., Chen YP., Wu JH., Huang CC., Wang SY., Yang NS. and Shyur LF.: A

galactolipid possesses novel cancer chemopreventive effects by suppressing inflammatory mediators and mouse B16 melanoma, *Cancer Res*, 67, 6907-6913(2007).

19) Han LK., Li DX., Xiang L., Gong XJ., Kondo Y., Suzuki I. and Okuda H.: Isolation of pancreatic lipase activity-inhibitory component of spirulina platensis and it reduce postprandial triacylglycerolemia, *YAKUGAKU ZASSHI*, 126, 43-49(2006).

20) Cuong NX., Minh CV., Kiem PV., Huong HT., Ban NK., Nhiem NX., Tung NH., Jung JW., Kim HJ., Kim SY., Kim JA. and Kim YH.: Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of Cibotium barometz, *J.Nat. Prod.*, 72, 1673-1677(2009).

21) Andrianasolo EH., Haramaty L., Vardi A., White E., Lutz R. and Falkowski P.: Apoptosis-inducing galactolipids from a cultured marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, *J. Nat. Prod.*, 71, 1197-1201(2008).

22) Mizushima Y., Sugiyama Y., Yoshida H., Hanashima S., Yamazaki T., Kamisuki S., Ohta K., Takemura M., Yamaguchi T., Matsukage A., Yoshida S., Saneyoshi M., Sugawara F. and Sakagauchi K.: Galactosyldiacylglycerol, a mammalian DNA polymerase α-specific inhibitor from a sea alga, *Petalonia bingbamiae, Biol. Pharm. Bull.* 24, 982-987(2001).

23) Iijima H., Musumi K., Hada T., Maeda N., Yonezawa Y., Yoshida H. and Mizushina Y.: Inhibitory effect of monogalactosyldiacylglycerol, extracted from spinach using supercritical CO_2 on mammalian DNA polymerase activity, *J.Agric. Food Chem.*, 54, 1627-1632(2006).

24) Colombo D., Scala A., Taino IM., Toma L., Ronchetti F., Tokuda H., Nishino H., Nagatsu A., Sakakibara J.: Inhibitory effects of fatty acid monoesters of 2-O-β-D-glucosylglycerol on Epstein-Barr virus activation, *Cancer Letters,* 123, 83-86(1998).

25) Albini FM., Murelli C., Patritti G. and Rovati M.: A simple synthesis of glucosyl glycerols, *Synthetic Communications*, 24, 1651-1661(1994).

26) Goedl C., Sawangwan T., Mueller M., Schwarz A. and Nidetzky B.: A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-O-(α-D-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a

natural osmolyte and useful moisturizing ingredient, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 10086-10089(2008).

27) Schwarz A., Thomsen MS., Nidetzky B.: Enzymatic synthesis of β-glucosylglycerol using a continuous-flow microreactor containing thermostable β-glycoside hydrolase CelB Immobilized on coated microchannel walls, *Biotechnol. Bioeng.*, (2009).

28) 辰馬本家酒造株式会社: α-D-グルコピラノシルグリセロールの製造方法, 特願2006-177962.

29) Nakano H., Takenishi S. and Watanabe Y.: Formation of transfer products from soybean arabinogalactan and glycerol by galactanase from *Penicillium citrinum*, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1913-1921(1988).

30) Shinoyama H., Yamasawa A., Ando A. and Fujii T.: Transxylosyl reaction of *Aspergillus niger* β-xylosidase in the presence of polyhydric alcohols and enzymatic synthesis of xylosyl glycerol, *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, 45, 71-77(1992).

31) Weiwer M., Sherwood T. and Linhardt RJ.: Synthesis of floridoside, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 27, 420-427(2008).

32) 竹村裕子: 寒天オリゴ糖の生産と精製に関する研究, 高知工科大学修士論文(2007).

33) Chen H., Yan X., Zhu P. and Lin J.: Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*, *Nutrition Journal*, 5:31(2006).

34) Schachter H, Methods Enzymol., 41,3-10 (1975).

35) Kidby DK. and Davidson DJ.: A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range., *Analytical Biochemistry.*, 55, 321-325(1973).

36) Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar., *Anal.Chem.*, 31,426-428(1959).

37) Yoshikawa M., Nishida N., Shimoda H., Takada M., Kawahara Y. and Matsuda H.: Polyphenol Constituents from Salacia Species: Quantitative Analysis of Mangiferin with a-Glucosidase and Aldose Reductase Inhibitory Activities, *YAKUGAKU ZASSHI* 121, 371-378(2001).

38) Chen HM., Zheng L. and Yan XJ.: The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides, *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 29-36(2005).

39) Kubo I., Chen QX., Nihei KI., Calderon JS. and Cespedes CL.: Tyrosinase inhibition kinetics of anisic acid, *Z. Naturforsch.*, 58c, 713-718(2003).

40) Kimura H., Naganuma K., Kojima M. and Onda T.: Elucidation of functionality of local agricultural products and its application to functional food, *research paper*, No.21(2007).

41) Togashi I., Yoneyama S., Takizawa N.: Cellulase activity of Coprinus sp. (HFP-Co 90-6), *J.Hokkaido For. Prod. Res. Inst.* Vol.7,No.3,(1993).

42) 豊川哲也, 鎌田靖弘, 照屋正映, 上地美香, 新垣美香, 市場俊雄: 沖縄県産植物抽出物のリパーゼ阻害活性, 沖縄県工業時術センター研究報告書, 第 5 号(2003).

43) Hondo M., Shimizu J., Shiomi N.: Preparation of functional oligosaccharides from inulin in chicory roots: Functional properties of inulo-oligosaccharides, *Hokkaido Industrial Research Institute report*, No290(1991).

44) Meng J., Rosell KG. and Srivastava LM.: Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforate*, *Carbohydrate Research*, 161, 171-180(1987).

45) Simon-Colin C., Kervarec N., Pichon R., Deslandes E.: Complete ^{1}H and ^{13}C spectral assignment of floridoside, *Carbohydrate Research*, 337, 279-280(2002).

46) Tanaka O.: Application of ^{13}C-nuclear magbetic resonance spectrometry to structural studies on glycosides: saponins of Panax app. and natural sweet glycosides, *YAKUGAKU ZASSHI*, 105, 323-351(1985).

47) Bondu S., Kervarec N., Deslandes E. and Pichon R.: Separation of floridosides by HPLC and complete ^{1}H and ^{13}C NMR spectral assignment for D-isofloridoside, *Carbohydrate Research*, 342, 2470-2473(2007).

48) Macler BA.: Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red alge, *gelidium coulteri*, *Plant physiol.*, 82, 136-141(1986).

49) Glazer AN., Chan CF., Karsten U., West JA.: Salinity tolerance, biliproteins, and

floridoside content of *compsopogon coeruleus* (rhodophyta), *J.Phycol.*, 30, 457-461(1994).

50) 長谷川香料株式会社: グルコシド類の製法, 特願 1995-205140.

51) 花王株式会社: アルキルガラクトシドの製造方法, 特願 2005-379805.

52) Hirabayashi J.: Glycan structures, clues to the origin of saccharides, *Viva Origino*, 29, 119-133(2001).

53) 松下至: 液体クロマトグラフィー100 のテクニック, 技報堂出版, 21(1997).